

MASTEROPPGAVE I LEGEMIDDELANALYSE FOR GRADEN MASTER I FARMASI

LC-MS/MS-DIFFERENSIERING AV NEURONSPESIFIKK ENOLASE I SERUM

*Et potensielt verktøy innen diagnose
av småcellet lungekreft*

Sandra Gransbråten Løvbak



Avdeling for farmasøytisk kjemi

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Vår 2012

LC-MS/MS-DIFFERENSIERING AV NEURONSPESIFIKK ENOLASE I SERUM

*Et potensielt verktøy innen diagnose
av småcellet lungekreft*

Sandra Gransbråten Løvbak

Masteroppgaven ble utført ved faggruppen for legemiddelanalyse,
Avdeling for farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo
i perioden februar 2011 til mai 2012

Veiledere:

Professor Léon Reubsaet, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo
Førsteamanuensis Trine Grønhaug Halvorsen, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo
Stipendiat Silje Bøen Torsetnes, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo

Forord

Jeg vil rette en stor takk til mine engasjerte veiledere Léon Reubsaet, Trine Grønhaug Halvorsen og Silje Bøen Torsetnes for god oppfølging under arbeidet på lab og skriving av masteroppgaven. Dere har alltid tatt dere tid til meg, og det setter jeg utrolig stor pris på.

Til mine dyktige medstudenter, Ann Helene, Christine, Kari, Marit og Sara, som jeg har vært så heldig å få dele kontor med det siste året – takk for en hyggelig periode med mange faglige, men (heldigvis) flest ikke-faglige samtaler.

Videre vil jeg få takke hele avdelingen for legemiddelanalyse for et godt arbeidsmiljø, koselige lunsjer, nydelige fredagskaker og en heidundrende tur til Sandefjord. Det blir trist å forlate andre etasje.

Takk også til mine fantastiske venninner på kullet for faglige og sosiale stunder, mye latter og gode klemmer. Disse fem studieårene ville ikke vært de samme uten dere og måtte det gode vennskapet vare evig.

Sist, men ikke minst, vil jeg takke familie, venner og Tom Francis, som den siste tiden ikke har sett mye til meg. Det blir bedre tider nå. Takk for oppmuntrende ord og god støtte gjennom de fem siste årene.

Oslo, mai, 2012

Sandra Gransbråten Løvbak

Sammendrag

Kvantifisering av neuronspesifikk enolase (NSE) i serum er aktuelt ved diagnose av ulike sykdommer, deriblant småcellet lungekreft (SCLC). NSE er i dag etablert i klinikken for diagnose og monitorering av SCLC, hvor den kvantifiseres med immunoassay. Disse metodene har begrenset selektivitet og kan gi falske positive resultater. Samtidig er mangel på overenstemmelse mellom de ulike immunoassayene for NSE også et problem. På bakgrunn av dette ble det utviklet en mer selektiv metode med immunobasert prøveopparbeidelse og analyse med væskechromatografi (LC) koblet til tandem massespektrometri (MS/MS). I tillegg til å være mer selektiv kan denne metoden også differensiere mellom isoformene av NSE, noe som er av stor interesse for videre forskning på SCLC.

Den nyutviklede metoden for bestemmelse av NSE skal slås sammen med en allerede utviklet LC-MS/MS-metode for bestemmelse av progastrinfrigjørende peptid (ProGRP), en annen biomarkør for SCLC. Derfor ble metoden for ProGRP brukt som et utgangspunkt. Prøveopparbeidelsen ble optimalisert for NSE, mens HPLC-metoden ble beholdt for enklere sammenslåing av de to metodene. I tillegg ble det utviklet og optimalisert en SRM-metode for fire signaturpeptider og en intern standard. Det ble funnet to signaturpeptider for hver av isoformene α - og γ -enolase, hvor en var ment for kvantitativ måling, mens den andre var ment for kvalitativ sikkerhet.

Metoden ble validert for γ -enolase med 5 % bovint serumalbumin (BSA) som surrogatmatriks. Metoden viste god linearitet ($r^2 = 0,9994$) og god intradagnøyaktighet (91,5-100,9 %). Intradagpresisjon var god ($\leq 12,9$ %), mens interdag presisjon ble ansett som tilfredsstillende ($\leq 20,2$ %). Utbyttet varierte mellom 62 og 82 %. Deteksjonsgrense (LOD) ble estimert til 11,0 pg/mL, mens nedre kvantifiseringsgrense (LLOQ) ble estimert til 38,0 pg/mL. Metoden viste seg å være godt egnet for kvantifisering av γ -enolase i serum.

Innholdsfortegnelse

Forord.....	3
Sammendrag.....	4
Innholdsfortegnelse	5
1 Forkortelser	8
2 Innledning	10
2.1 Bakgrunn.....	10
2.2 Problemstilling	11
3 Teori.....	12
3.1 Aminosyrer, peptider og proteiner	12
3.1.1 Proteomikk	14
3.1.2 Bottom-up-strategi	15
3.2 Neuronspesifikk enolase.....	16
3.2.1 Struktur og isoformer	16
3.2.2 Biologisk aktivitet og forekomst	17
3.3 Prøveopparbeidelse av biologisk prøvematriks	18
3.3.1 Biologisk matriks – Serum	18
3.3.2 Selektiv opprensing	18
3.3.3 Proteolyse av proteinet	19
3.4 Separasjon og deteksjon v.h.a. væskekromatografi og massespektrometri.....	20
3.4.1 Væskekromatografi	20
3.4.2 Massespektrometri	21
3.5 Validering.....	26
3.5.1 Surrogatmatriks	26
3.5.2 Intern standard.....	27
4 Materialer	28
4.1 Kjemikalier, analytter og utstyr.....	28
4.2 Tillaging av løsninger	32
4.2.1 Løsninger.....	32
4.2.2 Prøvematriks.....	34
4.2.3 Løsninger til immunoekstraksjon.....	34
4.2.4 Løsninger til tryptisk proteolyse	35

4.2.5	Mobilfaser	36
5	Metoder	37
5.1	<i>In-solution</i>-proteolyse av standarder	37
5.2	Prøveopparbeidelse for NSE i serum og 5 % BSA	37
5.2.1	Vask av kuler.....	37
5.2.2	Immunoekstraksjon	38
5.2.3	Tryptisk proteolyse.....	38
5.2.4	Klargjøring av prøver for analyse	39
5.3	LC-MS/MS-analyse av NSE	40
5.3.1	HPLC-parametere.....	40
5.3.2	MS-parametere	42
5.4	Databaser og dataverktøy	44
5.4.1	The Universal Protein Resource (UniProt)	44
5.4.2	ProteinProspector	44
5.4.3	Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)	45
5.4.4	Proteome Discoverer	46
5.4.5	Behandling av eksperimentelle data i Xcalibur.....	46
5.5	Validering.....	46
5.5.1	Prøvematriks.....	46
5.5.2	Bruk av intern standard	46
5.5.3	Nøyaktighet	47
5.5.4	Presisjon	47
5.5.5	Kalibreringskurve og linearitet.....	47
5.5.6	Deteksjonsgrense og nedre kvantifiseringsgrense.....	47
5.5.7	Utbytte	48
5.5.8	Stabilitet	49
5.5.9	Selektivitet.....	49
6	Resultater og diskusjon.....	50
6.1	Kartlegging av potensielle signaturpeptider	50
6.1.1	Identifisering av spesifikke peptider	50
6.1.2	Deteksjon av potensielle signaturpeptider.....	50
6.1.3	Signaturpeptider	54

6.2	Optimalisering av MS-metoden	57
6.2.1	SRM	57
6.3	LC-metode.....	59
6.4	Prøveopparbeidelse	60
6.4.1	Ekstraksjonstid	60
6.5	Pre-validering.....	61
6.5.1	Valg av valideringsstandard	61
6.5.2	Matriks fri for analytt	62
6.5.3	Surrogatmatriks	65
6.6	Validering.....	67
6.6.1	Nøyaktighet	67
6.6.2	Presisjon	67
6.6.3	Kalibreringskurve og linearitet.....	68
6.6.4	Deteksjonsgrense og nedre kvantifiseringsgrense.....	69
6.6.5	Utbytte	69
6.6.6	Stabilitet	70
6.6.7	Selektivitet.....	72
7	Konklusjon og videre arbeid	74
	Kildeliste.....	75
	Appendiks 1	79
	Appendiks 2	81

1 Forkortelser

ABC	Ammoniumbikarbonat
ACN	Acetonitril
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Bovint serumalbumin
CID	Kollisjonsindusert dissosiasjon (Collision induced dissociation)
Da	Dalton
DTT	1,4-ditiotretiol
ESI	Elektrosprayionisering
g	Gram
HPLC	Væskeskromatografi (High Performance Liquid Chromatography)
IAA	2-jodeddiksyre
IS	Intern standard
k	Kilo
L	Liter
LC	Væskeskromatografi
LLOQ	Nedre kvantifiseringsgrense (Lower limit of quantification)
LOD	Deteksjonsgrense (Limit of detection)
m	Milli
M	Molar
MALDI	Matrisestøttet laserdesorpsjon

MS	Massespektrometri
MS/MS	Tandem massespektrometri
m/z	masse/ladning
n	Nano
NSE	Neuronspesifikk enolase
p	Piko
PBS	Fosfatbufret salin
PMF	Peptide mass fingerprint
PTM	Post-translasjonsmodifikasjon
ProGRP	Progastrinfrigjørende peptid (Progastrin-releasing peptide)
Q1	Den første masseanalysatoren i en trippelkvadrupol
q2	Kollisjonscellen i en trippelkvadrupol
Q3	Den tredje masseanalysatoren i en trippelkvadrupol
RSD	Relativt standardavvik
SCLC	Småcellet lungekreft
SD	Standardavvik
SRM	Selected reaction monitoring
TIC	Total ion chromatogram
μ	Mikro

For aminosyrenes forkortelser på en og tre bokstaver, se figur 3-1, s 14.

2 Innledning

2.1 Bakgrunn

Lungekreft er en av de vanligste kreftsykdommene i Norge [1]. Sykdommen forekommer i to overordnede former: småcellet (SCLC) og ikke-småcellet lungekreft (NSCLC). Omkring 15-20 % av pasientene har den mest aggressive formen SCLC, hvor overlevelsesraten er på under 5 % etter 5 år [1, 2]. Sykdommen er, til tross for dårlig overlevelsesrate, meget sensitiv for behandling når den oppdages på et tidlig stadium, men rask vekst og metastasering vanskeliggjør dette [1, 2]. Man er avhengig av å oppdage sykdommen før tumoren har rukket å bli så stor at den er synlig for bildediagnostikk.

Kroppsegne markører for blant annet sykdom, såkalte biomarkører, er et viktig verktøy for tidligere og mer spesifikk diagnostisering. Flere biomarkører er vist å kunne detekteres i økt konsentrasjon i blod ved SCLC, deriblant neuronspesifikk enolase (NSE) og progastrinfrigjørende peptid (ProGRP) [2-4]. NSE er i dag etablert i klinikken for diagnose og monitorering av SCLC, hvor den bestemmes ved bruk av immunometriske metoder, deriblant *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Immunometriske metoder er generelt enkle i bruk, relativt billige og veldig sensitive [5]. På en annen side har de begrenset selektivitet og kan gi falske positive resultater [5-7]. Grunnen til dette er at immunoassay i noen tilfeller ikke klarer å skille mellom strukturelle og kjemiske ulikheter i proteinene utenfor det området som gjenkjennes av antistoffet [5]. En annen ulempe er mangel på overensstemmelse mellom forskjellige immunoassay for NSE [8]. Nøyaktig kvantifisering ved bruk av sikrere metoder er derfor begrenset og data bør tolkes med forsiktighet [7].

Analyse av proteiner i biologiske matrikser med væskechromatografi (LC) koblet til tandem massespektrometri (MS/MS) blir mer og mer utbredt [6]. Utvikling og validering av slike metoder kan være utfordrende, men sammenliknet med dagens metoder viser de høyere presisjon og nøyaktighet [5]. I tillegg gir det mulighet for å måle flere analytter i samme analyse og differensiere mellom flere isoformer av proteinene. Differensiering av isoformer er av stor interesse, og en slik metode kan derfor være et nyttig verktøy i videre forskning på SCLC.

2.2 Problemstilling

Det overordnede målet for denne oppgaven var å utvikle og optimalisere en analysemetode for kvantifisering av NSE i serum, med immunbasert prøveopparbeidelse og LC-MS/MS som analysemetode. Metoden skulle kunne differensiere mellom isoformene α - og γ -enolase.

Arbeidet inngår som en del av stipendiat Silje Bøen Torsetnes sitt doktorgradsprosjekt ved Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo. Hun har utviklet en metode for kvantifisering av ProGRP, en annen biomarkør for SCLC, i serum, og målet er å utvikle en tilsvarende metode for NSE. Metodene for kvantifisering av ProGRP og NSE skal på et senere tidspunkt slås sammen til en felles metode for begge proteinene.

Det ble satt følgende delmål for oppgaven:

- Finne signaturpeptider for α - og γ -enolase.
- Utvikle en SRM-metode for analyse av α - og γ -enolase.
- Optimalisere prøveopparbeidelsen.
- Validere metoden etter gjeldende retningslinjer.

3 Teori

3.1 Aminosyrer, peptider og proteiner

Proteiner er cellenes byggesteiner [9, 10]. De kan være det som gir cellen sin struktur, enzymer som katalyserer intracellulære reaksjoner, signalstoffer som overfører informasjon mellom celler eller de kan opptre i mer spesialiserte former som for eksempel antistoffer eller toksiner [9]. Proteinene har med andre ord stor variabilitet og forekommer i utallige typer og størrelser [10].

Alle proteinene i kroppen er bygget opp av 20 ulike aminosyrer [9, 10]. Aminosyrene har en fellesstruktur som består av en karboksylgruppe og en aminogruppe, som begge er bundet til samme karbonatom, α -karbonet [10]. Til dette α -karbonet er det også bundet en sidekjede (R) som er ulik for hver aminosyre og som gir den dens unike egenskaper [9, 10]. I proteiner og peptider er aminosyrenes fellesstruktur bundet sammen via amidbindinger, slik at det dannes en repeterende sekvens som utgjør grunnkjelettet i aminosyrekjeden [9, 10]. Klassifiseringen av aminosyrer basert på sidegruppens egenskaper er presentert i tabell 3-1, sammen med aminosyrenes monoisotopmasse og forkortelser på en og tre bokstaver.

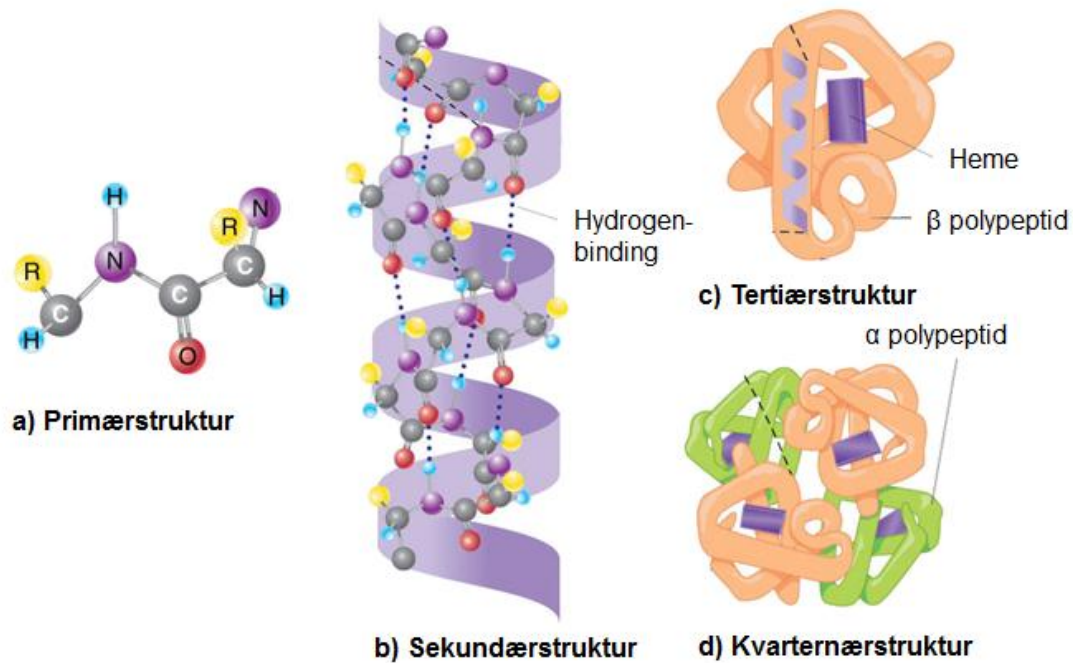
Proteinets struktur beskrives på fire kompleksitetsnivåer. Rekkefølgen til aminosyrene i proteinet utgjør proteinets primærstruktur (figur 3-2 a). Denne aminosyrekkefølgen bestemmer hvordan peptidet folder seg ved at det dannes intramolekulære bindinger, f.eks. hydrogenbindinger, mellom aminosyrene. Slike lokale tredimensjonale foldinger kan være såkalte α -heliks og β -sheet, og disse utgjør proteinets sekundærstruktur (figur 3-2 b). Proteinets tertiærstruktur inkluderer hele proteinets tredimensjonale folding (figur 3-2 c). Når to eller flere proteinmolekyler danner komplekser kalles denne organiseringen, proteinets kvaternærstruktur (figur 3-2 d).

Når noen få aminosyrer er bundet sammen, kalles molekylet et oligopeptid. Når mange aminosyrer bindes sammen, kalles det et polypeptid. Terminologien polypeptid og protein brukes ofte om hverandre, men definisjonen beskriver polypeptider som aminosyrekjeder med en molekylvekt under 10 kDa, mens proteiner er definert som aminosyrekjeder med en molekylvekt over 10 kDa [10].

Når man beskriver peptider som generes fra proteiner ved proteolyse brukes gjerne betegnelser som N-terminal og C-terminal ende. N-terminal (aminoterminal) ende viser til den delen av aminosyrekjeden som har en fri aminogruppe etter proteolysen [10]. C-terminal (karboksylterminal) ende beskriver den delen som har en fri karboksylgruppe [10].

Tabell 3-1 Oversikt over de 20 naturlig forekommende aminosyrene, klassifisert etter sidekjedenes egenskaper, inkludert aminosyrens monoisotope masse og forkortelser på en og tre bokstaver [9, 10].

Sidekjedens egenskaper	Aminosyre	Forkortelser	Monoisotop masse (Da)
Upolar og alifatisk	Alanin	A, Ala	71,04
	Glycin	G, Gly	57,02
	Isoleucin	I, Ile	113,08
	Leucin	L, Leu	113,08
	Metionin	M, Met	131,04
	Valin	V, Val	99,07
Aromatisk	Fenylalanin	F, Phe	147,07
	Tryptofan	W, Trp	186,08
	Tyrosin	Y, Tyr	163,06
Polar og uladet	Asparagin	N, Asn	114,04
	Cystein	C, Cys	103,01
	Glutamin	Q, Gln	128,06
	Prolin	P, Pro	97,05
	Serin	S, Ser	87,03
	Treonin	T, Thr	101,05
Basisk	Arginin	R, Arg	156,10
	Histidin	H, His	137,00
	Lysin	K, Lys	128,09
Sur	Asparaginsyre	D, Asp	115,03
	Glutaminsyre	E, Glu	129,04



Figur 3-1 a) Primærstrukturen, aminosyrene bundet sammen med amidbindinger. b) Sekundærstrukturen, lokale tredimensjonale foldinger i proteinet, illustrert med en α -helix. c) Tertiærstrukturen, den tredimensjonale foldingen til hele proteinet. d) Kvarternærstrukturen, flere proteiner bundet sammen i et proteinkompleks. Hemoglobin, med sine fire subenheter, er vist som et eksempel. Tilpasset fra [11].

3.1.1 Proteomikk

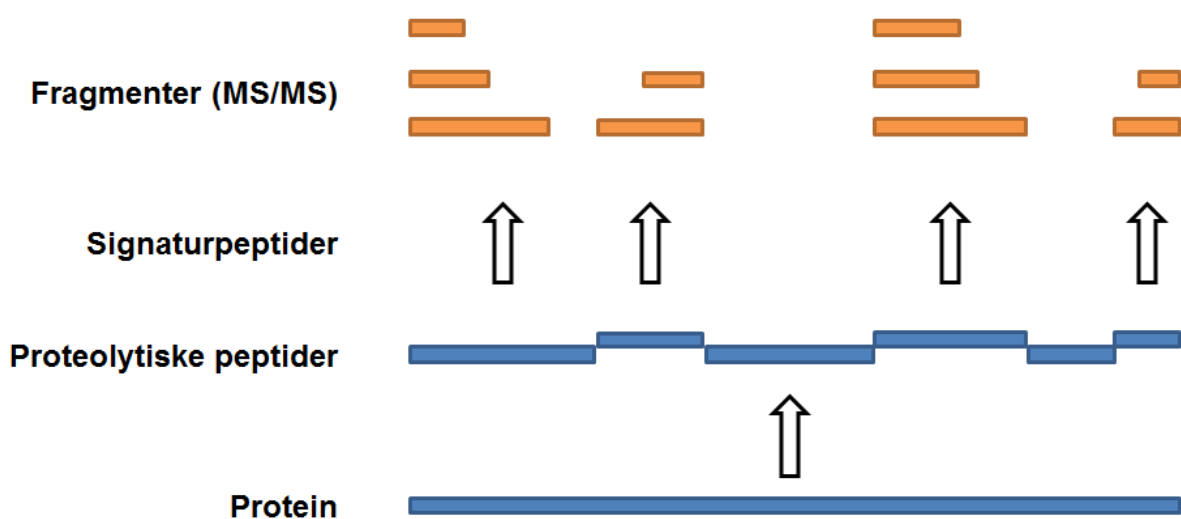
Proteomikk er studien av alle eller store deler av proteinene i kroppen, også kalt proteomet [12]. Gener uttrykker proteiner, men ikke alle proteiner uttrykkes i alle celler [13]. Monitorering av proteinene kan derfor i mange tilfeller fortelle mer om organismens tilstand enn hva monitorering av gener kan. Cellens uttrykk av proteiner avhenger først og fremst av celletype, men også av cellens tilstand. Det er vist at cellulære prosesser, spesielt ved sykdom, bestemmes av flere proteiner, og det er derfor viktig å fokusere på proteomet og ikke bare ett protein [14].

Et av målene med proteomikk er å karakterisere og kvantifisere alle proteinene som uttrykkes i en organisme [12, 14]. Identifiseringen av proteinene skjer ved hjelp av strategiene top-down og bottom-up. I denne oppgaven ble bottom-up-strategien, også kalt *shotgun* proteomikk, brukt for å identifisere potensielle signaturpeptider for α - og γ -enolase.

3.1.2 Bottom-up-strategi

Ved bruk av bottom-up-strategien proteolyseres rensset protein eller en blanding av proteiner, og man får en løsning som potensielt inneholder store mengder peptider [15, 16]. Disse peptidene separeres med gelelektroforese eller væskechromatografi (LC) før de analyseres med MS [15, 16]. Ved 1D eller 2D gelelektroforese skilles peptidene basert på deres isoelektriske punkt og størrelse, mens LC separerer peptidene basert på deres kjemiske og fysikalske egenskaper [16]. Sistnevnte metode har vært ytterst suksessfull for identifisering av proteiner i komplekse matrikser, noe som gjør den velegnet for proteomisk analyse av biologiske prøver [16].

Massespekteret som genereres fra ett enkelt MS-eksperiment av peptider kalles peptidets *mass fingerprint* (PMF) [15, 16]. Dette spekteret kan bidra til identifisering av peptidet ved å sammenlikne det med spektre fra *in silico*-proteolysen i databaser [15]. PMF er alene ikke nok til å kunne gjøre en sikker proteinidentifikasjon [15]. MS/MS-eksperimenter har vært et gjennombrudd innen identifisering av proteiner og peptider [15]. I et MS/MS-eksperiment fragmenteres peptidet med kollisjonsindusert dissosiasjon (CID) og det dannes karakteristiske fragmenter som gir opphav til et MS/MS-spekter (figur 3-2). Dette spekteret kan sammenliknes med MS/MS-spektre i databaser og på den måten kan man identifisere peptidet [16]. Fragmentene kan også brukes til å utlede aminosyresekvensen til peptider og proteiner [16]. Dette er nærmere beskrevet i avsnitt 3.4.2.



Figur 3-2 Oversikt over bottom-up-strategien for identifisering av proteiner og peptider med MS/MS. Tilpasset fra [17].

3.2 Neuronspesifikk enolase

Enolase, også kjent som 2-fosfo-D-glycerat hydralase, ble omkring år 1940 oppdaget som et enzym involvert i glykolysen [18]. Enzymet forekommer naturlig både i menneskekroppen og hos andre virveldyr [19]. Neuronspesifikk enolase (NSE), en form av enzymet, uttrykkes i økt konsentrasjon ved ulike sykdomstilstander, deriblant småcellet lungekreft (SCLC). Ved SCLC kan NSE detekteres i serum i en konsentrasjon på over 100 ng/mL. NSE er i dag en veletablert biomarkør for diagnose av sykdommen og monitorering av behandlingen av denne.

3.2.1 Struktur og isoformer

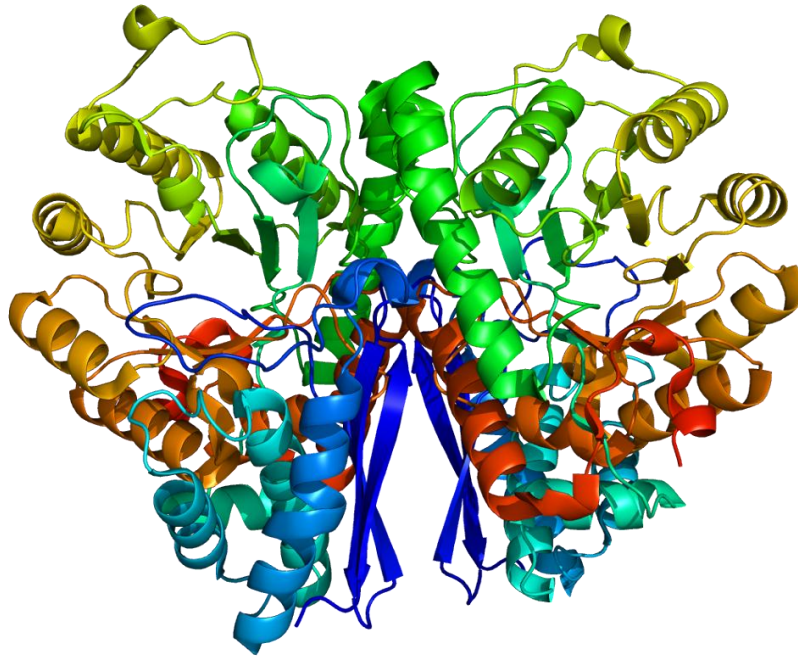
Enolase uttrykkes av tre gener som gir opphav til én isoform hver [20]. De tre isoformene, α , β og γ , består alle av 434 aminosyrer (figur 3-3 og 3-4) og har en molekylvekt på mellom 42 og 47 kDa [21-23]. α -enolase (NNE; non-neuron enolase) uttrykkes i alle vev, β -enolase (MSE; muskelspesifikk enolase) uttrykkes hovedsakelig i muskelvev, mens γ -enolase (NSE) uttrykkes i neuroner og neuroendokrine celler [24]. Enolase opptrer i kroppen som både monomere og dimere. De vevsspesifikke isoformene, β - og γ -enolase danner heterodimere enzymer med α -enolase og homodimere enzymer i form av $\beta\beta$ og $\gamma\gamma$ [20]. NSE omfatter isoformene $\alpha\gamma$, $\gamma\gamma$ (figur 3-5) og γ [25].

MSILKIHAR	EIFDSRGNPTV	EVDLFTSKGL	FRAAVPSGAS	TGIYEALRL	DNDKTRYMGK
GVSKAVEHIN	KTIAPALVSK	KLVNTEQEKI	DKLMIEMDGT	ENKSKFGANA	ILGVSLAVCK
AGAVEKGVPL	YRHIADLAGN	SEVILPVPAP	NVINGGSHAG	NKLAMQEFMI	LPVGAANFRE
AMRIGAEVYH	NLKNVIKEKY	GKDATNVGDE	GGFAPNILEN	KEGLELLKTA	IGKAGYTDKV
VIGMDVAASE	FFRSGKYDL	FKSPDDPSRY	ISPDQLADLY	KSFIKDYPVV	SIEDPFDQDD
WGAWQKFTAS	AGIQVVGDDL	TVTNPBKRIAK	AVNEKSCNCL	LLKVNQIGSV	TESLQACKLA
QANGWGVMS	HRSGETEDTF	IADLVVGLCT	GQIKTGAPCR	SERLAKYNQL	LRIEEELGSK
AKFAGRNFRN	PLAK				

Figur 3-3 α -enolases primærstruktur. Aminosyrene som er en del av det aktive setet er farget blå [21, 24]

MSIEKIWARE	ILDSRGNPTV	EVDLYTAKGL	FRAAVPSGAS	TGIYEALRL	DGDKQRYLGK
GVLKAVDHIN	STIAPALISS	GLSVVEQEKI	DNLMLELDGT	ENKSKFGANA	ILGVSLAVCK
AGAAERELPL	YRHIAQLAGN	SDLILPVPAP	NVINGGSHAG	NKLAMQEFMI	LPVGAESFRD
AMRLGAEVYH	TLKGVIKDKY	GKDATNVGDE	GGFAPNILEN	SEALELVKEA	IDKAGYTEKI
VIGMDVAASE	FYRDGKYDL	FKSPTDPSRY	ITGDQLGALY	QDFVRDYPVV	SIEDPFDQDD
WAAWSKFTAN	VGIQIVGDDL	TVTNPBKRIER	AVEEKACNCL	LLKVNQIGSV	TEAIQACKLA
QENGWGVMS	HRSGETEDTF	IADLVVGLCT	GQIKTGAPCR	SERLAKYNQL	MRIEEELGDE
ARFAGHNFRN	PSVL				

Figur 3-4 γ -enolases primærstruktur. Aminosyrene som er en del av det aktive setet er farget blå, mens spesifikke områder, potensielle for selektiv antistoffbinding, er farget røde [23, 24].



Figur 3-5 NSE i form av to γ -subenheter bundet sammen i ett proteinkompleks [26].

α - og γ -enolase er strukturelt veldig like og skiller seg fra hverandre ved kun 72 av 434 aminosyrer. I områdene som er en del av de aktive setene, aminosyrene 144-216 og 363-417 (figur 3-3 og 3-4), viser primærstrukturen til proteinene liten variasjon [24]. Det er også funnet områder i aminosyresekvensen til γ -enolase som skiller seg fra aminosyresekvensen til α -enolase i så stor grad at de er potensielle for spesifikk antistoffbinding [24]. Dette gjelder aminosyrene 271-285, 298-316 og 416-433 (figur 3-4) [24].

3.2.2 Biologisk aktivitet og forekomst

NSE er et metallenzym som katalyserer dehydreringen av 2-fosfo-D-glycerat (PGA) til fosfoenolpyruvate (PEP) i glykolysen og den motsatte reaksjonen i glukoneogenesen [20]. Det aktive enzymet er en dimer som består av enten to γ -subenheter eller en α -subenhet og en γ -subenhet.

NSE finnes som nevnt naturlig i kroppen og forekommer ved ikke-patologiske tilstander i en konsentrasjon på omtrent 10 ng/mL i serum [4]. Det er blant annet funnet betydelige mengder av NSE i hjernen og proteinet utgjør her mellom 0,4 og 2,2 % av den totale proteinmengden [20]. Årsaken til denne høye konsentrasjonen i neuroner er fortsatt ikke kjent, men man vet at neuroner er fullstendig avhengig av energien de får gjennom glykolysen [20].

3.3 Prøveopparbeidelse av biologisk prøvematriks

3.3.1 Biologisk matriks – Serum

Analyse av biologiske matrikser er den viktigste tilnærmingen for diagnose av sykdom og monitorering av behandling [27]. Av kroppens biologiske matrikser er blod den mest tilgjengelige for prøvetaking, samtidig som det inneholder mye informasjon om hele kroppens fysiologiske tilstand på det gitte tidspunktet. Blodet kan blant annet avdekke fysiologisk ubalanse som ikke gjør seg til kjenne ved patologiske symptomer [27].

Serum utgjør 54-59 % av fullblod og består av vann, proteiner, små uladete forbindelser og ioner [28]. Proteinene utgjør en viktig bestanddel i serum, og innholdet er typisk 56-80 mg/mL [29]. Proteinene i serum består av proteiner med funksjoner i blodet i tillegg til de proteinene som skilles ut fra organene [29]. Sammensetningen av proteinene i serum varierer som et resultat av endogene, potensielt patologiske, prosesser, og på grunn av miljømessig variasjon som diett og livsstil [27].

Det proteinet det er mest av i serum er serumalbumin som har en masse på omtrent 65 kDa. I en konsentrasjon på 30-50 mg/mL utgjør serumalbumin omtrent 60 % av den totale mengden protein i serum [28]. De største proteinene, immunoglobulinene, har en masse på omtrent 100 kDa, og utgjør til sammen omtrent 30 % av proteinene i serum. I tillegg inneholder serum en stor mengde andre proteiner. Fra et analyseperspektiv skaper denne kompleksiteten og proteinrikheten utfordringer. Proteinene har liknende kjemisk karakteristikk og er dermed vanskelige å separere. Samtidig vil en vanlig analysekolonne raskt kunne tettes da de ikke er kompatible med molekyler på størrelse med de største proteinene i serum. I tillegg er det mulig at de endogene proteinene har overlappende m/z -verdier med analytten, grunnet deres høye masse og brede isotopdistribusjon. Det er derfor essensielt å fjerne så mye som mulig av interfererende proteiner før analyse med LC-MS/MS, for å kunne bestemme konsentrasjoner av bestemte proteiner i serum [27, 29].

3.3.2 Selektiv opprensing

Selektiv proteinopprensing før proteolyse er ofte nødvendig for å oppnå tilstrekkelig lave kvantifiseringsgrenser for biomarkører [6]. Et eksempel på selektiv opprensing er immunoekstraksjon ved hjelp av antistoffbelagte magnetiske kuler. I tillegg til å være en

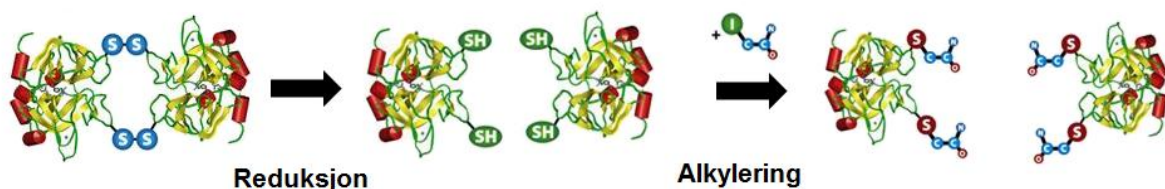
selektiv metode for opprensing av biologiske prøver, er immunoekstraksjon også egnet for oppkonsentrering av analytten.

De magnetiske kulene tilsettes prøven og antistoffene binder seg til proteinet de har affinitet for, som et antigen-antistoff kompleks. Kulene immobiliseres deretter ved hjelp av en magnet slik at prøveløsningen kan fjernes [6]. Det er utviklet mange antistoffer for γ -enolase, og disse har vist seg å ha ulik affinitet for de ulike formene av NSE [30]. I denne oppgaven brukes antistoff E21 som har høyere affinitet for $\alpha\gamma$ enn andre γ -enolaseantistoffer har [31]. Det er viktig å presisere at antistoffene kun har affinitet for γ -enolase, slik at hvis α -enolase detekteres kommer denne fra komplekset $\alpha\gamma$, ikke fra α eller $\alpha\alpha$.

3.3.3 Proteolyse av proteinet

Det kan være vanskelig å oppnå god selektivitet og sensitivitet for molekyler over 10 kDa hvis de analyseres i intakt form med MS, blant annet fordi de har flere ladninger og en stor isotopdistribusjon. For å unngå dette problemet benyttes gjerne proteaser som proteolyserer proteinet og danner surrogatpeptider som kan analyseres istedenfor proteinet [5, 6]. Trypsin er en mye anvendt protease på grunn av dens selektive spalting av peptidbindinger som kommer etter de positivt ladede aminosyrene lysin og arginin, med mindre de etterfølges av prolin i aminosyrekjeden [6, 13]. Proteolyse med trypsin har vist å gi peptider med aminosyrelengder som er godt egnet for analyse med MS [13].

Før proteinet proteolyseres må det denatureres slik at trypsin får tilgang til alle peptidbindingene. Til dette brukes 1,4-ditiotretiol (DTT) som reduserer disulfidbindinger mellom to cysteinmolekyler (figur 3-6) innad i peptidet [6]. Deretter brukes alkyleringsreagenset 2-jodeddiksyre (IAA) til å alkylere sulfhydrylgruppene (SH-gruppene) slik at disulfidbindingene ikke gjendannes (figur 3-6) [6].



Figur 3-6 Mekanismen for reduksjon av disulfidbindinger mellom to cysteinmolekyler ved bruk av DTT og alkylering av sulfhydrylgruppene (SH-gruppene) ved bruk av IAA. Tilpasset fra [32].

3.4 Separasjon og deteksjon v.h.a. væskekromatografi og massespektrometri

Bruken av væskekromatografi (LC) koblet til tandem massespektrometri (MS/MS) har etablert seg som en gullstandard for små molekyler [6]. Gradvis har den også utviklet seg til å være et attraktivt alternativ for kvantifisering av større molekyler, og er nå, grunnet høy sensitivitet, selektivitet, nøyaktighet og kapasitet, den viktigste analysemetoden for karakterisering og kvantifisering av proteiner og peptider [6, 16, 33, 34].

3.4.1 Væskekromatografi

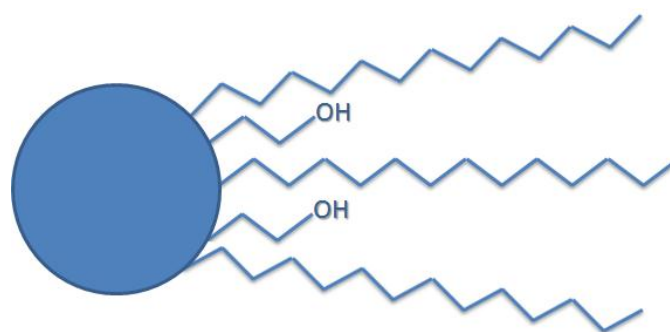
Kromatografi er fellesbetegnelse for separasjonsmetoder som skiller stoffer fra hverandre basert på deres kjemiske og fysikalske egenskaper [28]. I denne oppgaven ble væskekromatografi brukt for å separere peptider generert etter tryptisk proteolyse av α - og γ -enolase. I væskekromatografi transporteres peptidene med væske (mobilfase) gjennom et rør (kolonne) pakket med faste partikler (stasjonærfase), og peptidene separeres basert på deres affinitet til de to fasene. Peptidene som har større affinitet for stasjonærfasen enn de har for mobilfasen blir retardert og transporteres saktere gjennom kolonnen enn peptidene som har høyere affinitet for mobilfasen enn de har for stasjonærfasen [28].

Peptider analyseres hovedsakelig med omvendtfasekromatografi, hvor mobilfasen er hydrofil og stasjonærfasen er hydrofob [7, 8]. For kvantitative LC-MS-metoder for peptider har silikabaserte C18-kolonner vist å separere peptidene i best grad og er derfor mest brukt [5, 7].

Valg av mobilfaser er viktig for å oppnå god kromatografisk separasjon. Når LC er koblet til MS er kromatografisk separasjon av analyttene ikke avgjørende, men for best resultat er det allikevel en fordel [7]. Mobilfasene må i dette tilfellet være kompatible med elektrospayionisering (ESI) og de må ikke undertrykke ioniseringen av analytten [7]. Isokratisk eluering, eluering med samme mobilfasesammensetning gjennom hele analysen, har i mange tilfeller vist å gi dårlig form på toppene i kromatogrammet. Gradienteluering med økende løsemiddelkonsentrasjon, er å foretrekke da det gir god oppløsningsevne med kort analysetid [7, 15]. Acetonitril (ACN) og metanol er de vanligste løsemidlene ved separasjon av peptider med omvendtfasekromatografi, når denne er koblet til MS [5]. Deres lave overflatespenning, ionestyrke, viskositet og kokepunkt favoriserer separasjon av ladede molekyler og dannelse av ladede molekyler i gassfase [35].

Separasjonskolonne – AQUASIL C18

AQUASIL C18 kolonne er en type omvendtfasekolonne som er spesielt egnet for omvendtfase separasjon av polare stoffer [36]. Kolonnen er som mange andre omvendtfasekolonner, silikabasert og pakket med hydrofobe grupper (C18-grupper). AQUASIL skiller seg imidlertid fra andre omvendtfasekolonner ved at den også inneholder hydrofile grupper (figur 3-7) [36]. Disse hydrofile områdene øker retensjonen av sterkt hydrofile stoffer, for eksempel peptider. Kolonnens polare egenskaper gjør også at den kan ta imot store mengder mobilfase med lavt innhold av organisk løsemiddel (1-5 %) uten at den kollapser [36].



Figur 3-7 Pakkematerialet i AQUASIL C18.

Metoden for kvantifisering av NSE skal, som tidligere nevnt slås sammen med metoden som er utviklet av Silje Bøen Torsetnes, for kvantifisering av ProGRP. Det mest hydrofile signaturpeptidet til ProGRP krever at metoden starter med 1 % ACN i 20 mM maursyre for at dette skal retarderes tilstrekkelig på kolonnen [37]. Ordinære omvendtfasekolonner ville raskere kollapse under disse forholdene, og derfor er AQUASIL C18 funnet å være mer egnet for kvantifisering av ProGRP. For enklere å kunne overføre metoden for kvantifisering av NSE til en metode for begge proteinene, ble AQUASIL C18 valgt også her.

3.4.2 Massespektrometri

I et massespektrometer identifiseres analytter basert på deres m/z -verdi, analyttens masse over ladning ratio [8, 38]. Når ioner plasseres i et elektrisk felt vil de bøyes av med en konstant kraft og akselerasjonen av hvert ion er omvendt proporsjonal med dets m/z -verdi [8]. Et typisk massespektrometer består av tre komponenter, en ionekilde, en masseanalysator og en detektor [38]. For at stoffer skal analyseres må de være ladet og i gassfase [15, 38]. Når massespektrometeret er koblet til væskechromatografi sørger ionekilden for at væsken

omdannes til gass, samtidig som den gjør analytten ladet. Analytten transporteres deretter til masseanalysatoren hvor stoffene separeres basert på deres m/z -verdi. Videre detekteres stoffene i detektoren, som generer spektre basert på mengde ioner som treffer detektoren til en hver tid [38].

Massespektrometeret har gjennom tiden hatt en rekke anvendelsesområder, og i dag er den et viktig verktøy i rutinemessig analyse av proteiner og peptider [38, 39]. Det er først i de seneste tjue årene at massespektrometeret har vært egnet for analyse av slike biologiske molekyler. Tidligere utgjorde kravet om at analytten måtte være på gassform eller kunne gjøres flyktig ved å derivatiseres, en utfordring for bruk av MS innen bioanalyse [38]. Gjennombruddet kom med utviklingen av elektroprayionisering (ESI) og matrisestøttet laserdesorpsjon (MALDI) i 1990-årene [15, 38]. ESI og MALDI gjorde det mulig å danne ioner fra ikke-flyktige forbindelser uten at molekylene måtte derivatiseres eller at de ble ødelagt [15].

ESI gjør det mulig å danne ioner med flere ladninger av typen $[M+nH]^{n+}$. Ettersom MS separerer ioner etter deres masse over ladning ratio (m/z) vil deteksjon av molekyler med høy molekylærmasse i lavere m/z -områder være mulig [7, 38]. Dette gjør ESI til en velegnet teknikk for ionisering av større biomolekyler som proteiner og peptider [7].

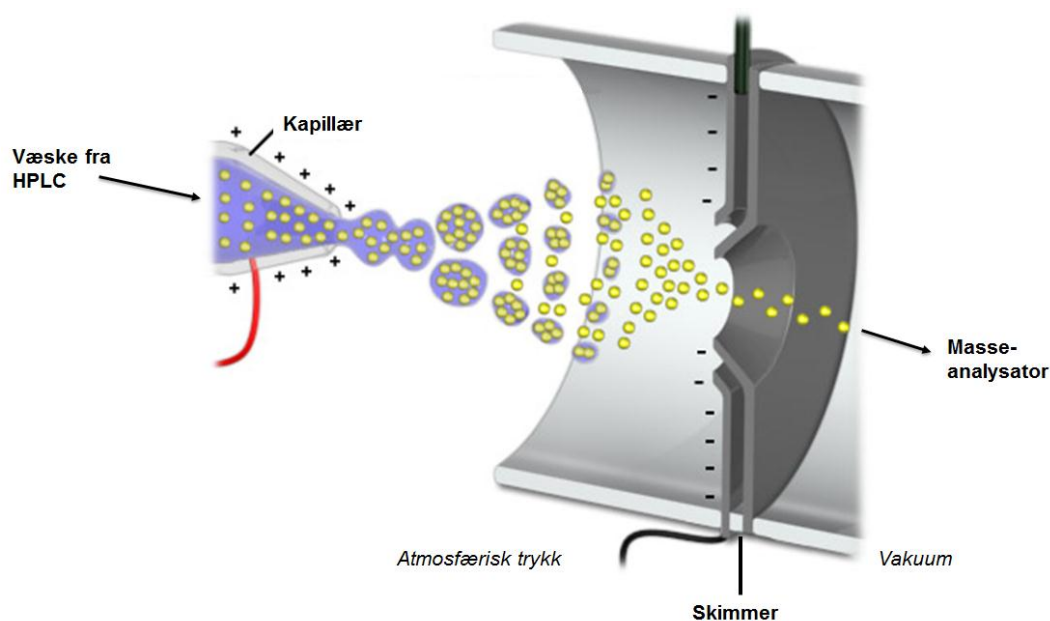
Det brukes mange ulike masseanalysatorer innen bioanalyse. I denne oppgaven ble det brukt lineær ionefelle og trippelkvadrupol. Begge apparatene ble brukt med ESI som ionekilde.

Ionekilde – Elektroprayionisering

ESI er en mild ioniseringsform som ioniserer polare, ikke-flyktige, høymolekylære og termolabile komponenter og som opererer ved atmosfære trykk [7].

Væske, for eksempel HPLC-systemet fra, fraktes inn i ionekilden gjennom et kapillær hvor det er lagt på en spenning (3-5 kV) [7, 15, 40]. Avhengig av om spenningen er positiv eller negativ dannes det henholdsvis positive og negative ioner. Ved utgangen av kapillæret vil det dannes en aerosol av små ladede dråper [15, 40]. Parallelt med kapillæret strømmes det ut tørkegass som sammen med varme gjør at væsken fordamper. Dråpene blir mindre og dette gjør at også avstanden mellom ladningene i dråpen blir mindre [15]. Til slutt blir overflatespenningen så stor at dråpene brytes opp i en såkalt *Coulomb eksplosjon* [40]. Dette resulterer i dannelsen av mindre ladede dråper. Disse mikrodråpene har en så stor ladning på

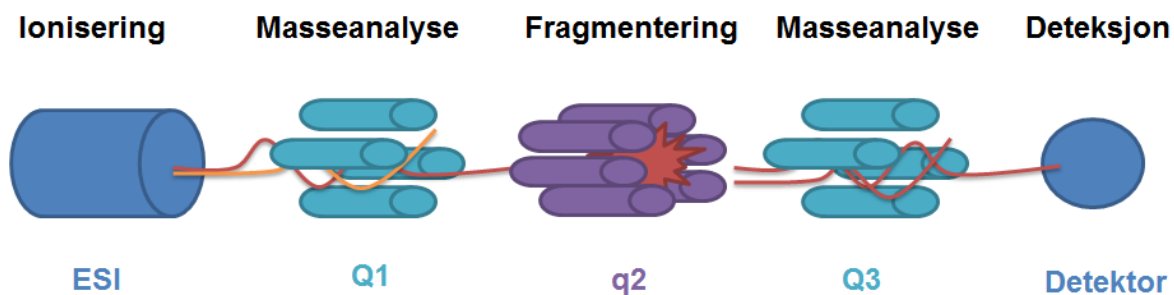
overflaten og vil igjen være så ustabile at de brytes opp i mindre dråper. Denne prosessen gjentar seg til det til slutt dannes ioner frie for løsemiddel [38]. Noen av ionene vil passere gjennom skimmeren inn i masseanalysatoren (figur 3-8) [38].



Figur 3-8 Elektrosprayionisering. Analytten transporteres i væsken fra HPLC-systemet inn i ionekilden hvor den ioniseres før den transporteres videre til MS for analyse. Tilpasset fra [41].

Masseanalysator – Trippelkvadrupol

En kvadrupol masseanalysator består av fire parallelle metallstenger som er elektrisk sammenkoblet to og to [38]. Ved å tilføre likestrøm (DC) og radiofrekvens (RF) dannes det et elektrisk felt mellom stengene [38]. Det elektriske feltet fungerer som et filter hvor alle eller kun utvalgte ioner slipper igjennom, basert på deres m/z -verdi. [38]. Ioner som eventuelt ikke slipper gjennom masseanalysatoren vil kollidere med stavene og nøytraliseres [38].



Figur 3-9 Trippelkvadrupol. I ESI dannes det ioner som separeres i Q1. Alle eller utvalgte ioner transporteres gjennom Q1 for fragmentering i q2. Fragmentene fra q2 separeres i Q3. Alle eller utvalgte fragmenter detekteres i detektoren.

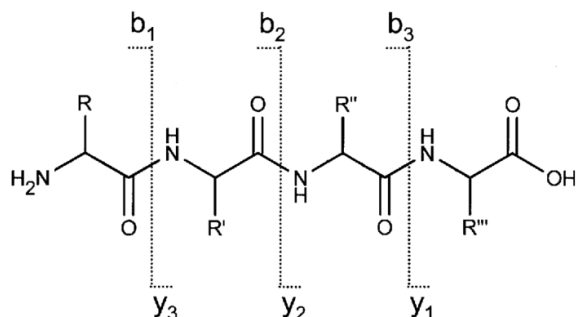
I en trippelkvadrupol er tre slike kvadrupoler satt i serie (figur 3-9). Den første (Q1) og den tredje kvadrupolen (Q3) er masseanalysatorer og filtrer ioner som beskrevet over [15, 38]. Den andre kvadrupolen (q2), egentlig en hexapol, fungerer som en kollisjonscelle hvor ionene som passerer gjennom Q1 kolliderer med nøytral argongass og fragmenteres ved kollisjonsindusert dissosiasjon (CID) [15, 38]. Fragmentene transporteres deretter videre til Q3 hvor alle eller utvalgte fragmenter slippes gjennom til detektoren, hvor de detekteres.

Masseanalysator – Lineær ionefelle

En lineære ionefelle er utformet på liknende måte som en kvadrupol. Fire ringelektroder ligger parallelt mellom to endeelektroder. Ionene som entrer MSen fra ionekilden fanges i det elektriske feltet mellom de to endeelektrodene. Ved å endre det elektriske feltet kan ionene enten destabiliseres og utstøtes fra ionefella, eller scannes ut for deteksjon, basert på deres m/z -verdi. Ionene kan også kollideres med helium inne i fella og på den måten fragmenteres ved CID. Dette gjør det mulig å utføre flere MS-eksperimenter etter hverandre (MS^n) i den lineære ionefella [7, 38].

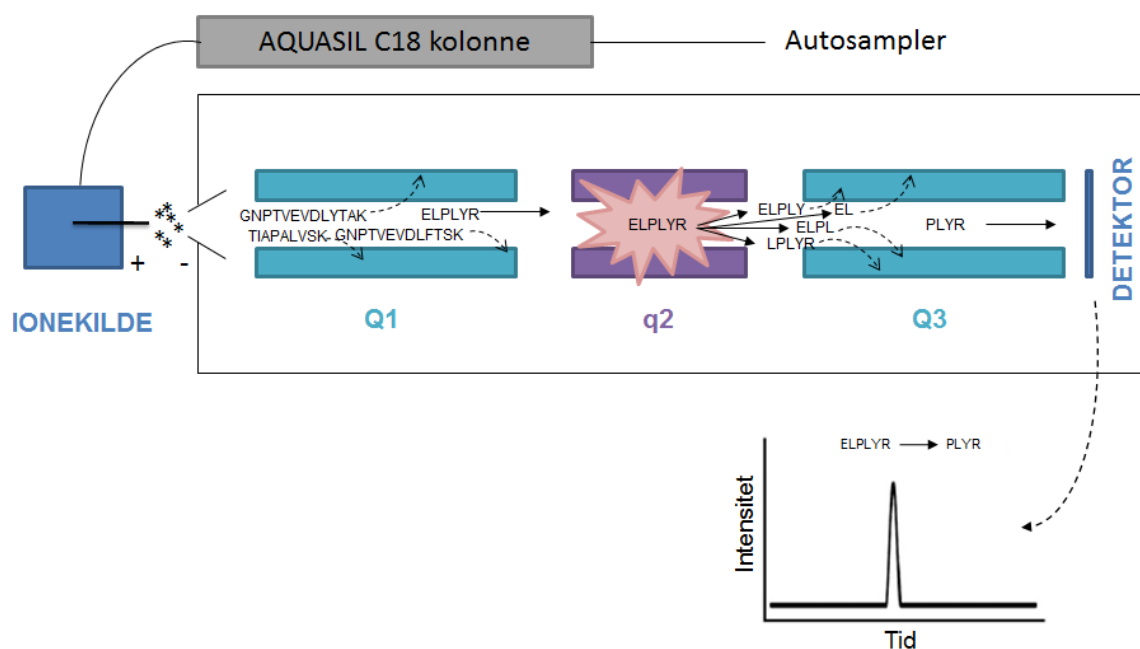
Identifisering og kvantifisering av peptider ved bruk av MS/MS

I massespektrometeret selekteres først peptidene ut i fra deres m/z -verdi, før de utvalgte peptidene fragmenteres med CID [15]. Når peptider fragmenteres med tilstrekkelig mengde energi vil generelt den svakeste bindingen, amidbindingen, brytes [7, 15]. Det dannes da b- og y-fragmenter som gir peptider med ulik lengde [15]. b-fragmentene dannes ved N-terminal ende, mens y-fragmentene dannes ved C-terminal ende [7]. Disse peptidfragmentene detekteres og danner et MS/MS-spekter [15]. Fra dette spekteret kan den virkelige sekvensen til peptidet bestemmes siden alle aminosyrer har unike masser (med unntak av leucin og isoleucin) [15].



Figur 3-10 Nomenklatur for peptidets mest vanlige fragmenter etter fragmentering med CID. b-fragmenter dannes ved N-terminal ende, mens y-fragmenter dannes ved C-terminal ende.

For kvantitative analyser er man avhengig av høy sensitivitet og selektivitet. Dette kan man få ved å bruke en trippelkvadrupol. Optimalisering gjøres ved å velge en eller noen spesifikke peptider som slipper gjennom Q1 og et eller noen få fragmenter som slipper gjennom Q3 og når detektoren (figur 3-11) [7, 8]. Signalintensiteten kan relateres til mengde analytt i prøven. Denne metoden kalles *selectiv reaction monitoring* (SRM) og eliminerer interferens fra forurensinger som eluerer samtidig som analytten [7].



Figur 3-11 En trippelkvadrupol i SRM-modus for deteksjon av signaturpeptidet ELPLYR. Peptidene separeres på kolonnen og ioniseres deretter i ionekilden før de entrer MSen. Kun ELPLYR slipper gjennom Q1 for fragmentering i q2. Fragmentene transporteres deretter til Q3 hvor det kun er fragmentet PLYR som slipper gjennom til detektoren. Mengden PLYR som treffer detektoren gir opphav til signalene i kromatogrammet. Tilpasset fra [8]

3.5 Validering

Valideringen av metoden skal dokumentere at utstyret og prosessene er egnet for det formålet de skal brukes til. Metoden ble validert etter følgende retningslinjer:

"Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation", U.S. Department of Health and Human Services [42].

"Guideline on bioanalytical method validation", European Medicines Agency [43].

Disse retningslinjene er ment for validering av metoder som skal måle konsentrasjon til legemiddel i biologisk matriks. Legemidler er som oftest små eksogene molekyler og har ingen eller få likhetstrekk med proteiner og peptider. Sistnevnte er store molekyler som er av samme natur som mange andre molekyler i kroppen, noe som gjør måling av disse i biologisk matriks utfordrende på andre måter enn for legemidler. Det er derfor viktig å merke seg at retningslinjene derfor ikke nødvendigvis direkte kan adopteres til validering av metoder for kvantifisering av proteiner.

3.5.1 Surrogatmatriks

Surrogatmatrikser varier i sin kompleksitet og kan i sin enkleste form bestå av kun vann eller buffer [34]. Fosfatbufret salin (PBS) er mye brukt som surrogatmatriks for plasma og serum fordi den har en liknende pH (7,4) og ionestyrke (150 mM) [34]. Ofte tilsettes bovint serumalbumin (BSA) eller humant serumalbumin (HSA) til PBS i konsentrasjonsområdet 40-60 mg/mL for å inkludere proteinkompleksiteten som plasma og serum har og for å øke løseligheten til hydrofobe analytter [34].

Det er noen utfordringer ved å validere en metode med surrogatmatriks. Analyttens løselighet kan være begrenset i surrogatmatriksen og analytten kan ekstraheres ulikt fra surrogatmatriksen sammenliknet med den autentiske matriksen [34]. Det må derfor undersøkes om ekstraksjonsvilkårene er tilsvarende i de to matriksene. En enkel måte å undersøke dette på er å lage en kalibreringskurve for analytten i de to matriksene etter prøveopparbeidelse med immunoekstraksjon og proteolyse, og deretter sammenlikne stigningstallene til de to kurvene. Har kurvene samme stigningstall indikerer dette at analytten ekstraheres ut i tilsvarende grad [34]. Den ideelle surrogatmatriks er fullstendig fri for analytt og er identisk med autentisk matriks med hensyn til løselighet og ekstraksjonsvilkår [34].

3.5.2 Intern standard

Intern standard (IS) er mye brukt i kvantitativ bioanalyse [7]. Den kan tilsettes ved ulike trinn i prøveopparbeidelsen og dermed korrigere for variabler ved forskjellige trinn i prosedyren [7]. I denne metoden var det et ønske om at IS skulle korrigere for variasjonen ved analyse med LC-MS/MS. MS-responsen kan variere mye på grunn av ulike parametere som er vanskelige å kontrollere [7].

Den ideelle IS har de samme fysikalske og kjemiske egenskapene som analytten og har dermed samme LC-retensjon og dermed identiske ESI- og MS-vilkår [7]. Ettersom IS og signaturpeptidet ideelt sett elueres samtidig, må de skilles fra hverandre ved forskjellig m/z -verdi. Mye brukt innen kvantifisering av proteiner og peptider er syntetiske isotope IS [6-8, 34]. Isotope IS lages ved å inkorporere isotoper, vanligvis ^{13}C og ^{15}N , på utvalgte aminosyrer i signaturpeptidet som skal brukes til kvantifisering av proteinet [6, 8]. Den brede isotopdistribusjonen i store molekyler gjør at IS må ha et betydelig antall isotoper for å være sikker på at den kan skilles fra analytten [5]. Isotopene vil danne et masseskift som vil skille IS fra signaturpeptidet [6, 7]. For korrigering benyttes ratioen mellom topparealet til signaturpeptidet og topparealet til IS.

4 Materialer

4.1 Kjemikalier, analytter og utstyr

Tabell 4-1 til og med 4-7, lister opp kjemikalier, analytter og utstyr benyttet under laboratoriearbeidet.

Tabell 4-1 Kjemikalier

Kjemikalie	Kvalitet	Leverandør
Acetonitril, CH ₃ CN	LC-MS-kvalitet	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Ammoniumbikarbonat, NH ₄ HCO ₃	≥ 99,5 %	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA
Dinatriumfosfatdihydrat, Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	≥ 99,5 %	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
DTT (1,4-ditiotretiol), C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂	≥ 99,0 %	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA
IAA (Jodeddiksyre), C ₂ H ₃ IO ₃	~ 99 %	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA
Kaliumdihydrogenfosfat, KH ₂ PO ₄	Analysekvalitet	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Kaliumklorid, KCl	> 99,5 %	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Maursyre, HCOOH	~ 98 %	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA
Metanol, CH ₃ OH	≥ 99,0 % (Hypergrade for LC-MS)	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA
Natriumklorid, NaCl	> 99,5 %	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Saltsyre, HCl	37 %, analysekvalitet	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Tris, NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃	> 99,9 %	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA
Tween [®] 20	-	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA

Tabell 4-2 Proteiner og peptider

Protein	Kvalitet	Leverandør
Bovint serum albumin	$\geq 96 \%$	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA
Heavy_ELPLYR [H]-ELPLYR[RC13N15]-[OH]	99 %	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA
Endogent γ -enolase (Hy-Test)	$> 95 \%$ (SDS-PAGE)	HyTest Ltd, Turku, Finland
Endogent γ -enolase (Scripps)	$\geq 95 \%$ (SDS-PAGE)	Scripps Laboratories, San Diego, CA, USA
Rekombinant α -enolase	$> 90 \%$	Fitzgerald Industries International, MA, USA
Rekombinant γ -enolase	86 units/mg protein	Radiumhospitalet, Oslo, Norge
Trypsin fra bovin pankreas	96,1 %	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA

Tabell 4-3 Utstyr til LC-MS/MS

Utstyr	Modell	Leverandør
Forkolonne	AQUASIL C18 10x1 mm i.d., 5 μ m partikkelstørrelse	Thermo scientific, Holger teknologi, Oslo, Norge
Separasjonskolonne	AQUASIL C18 50x1 mm i.d., 3 μ m partikkelstørrelse	Thermo scientific, Rockford, IL, USA

Tabell 4-4 Utstyr til lineær ionefelle

Utstyr	Modell	Leverandør
Autosampler/-injektor	WPS-3000	Dionex corp. Sunnyvale, CA, USA
Degasser	SOR-100	Dionex corp. Sunnyvale, CA, USA
Detektor	TSQ XL	Thermo scientific, Rockford, IL, USA
Programvare	Chromeleon v. 6.80 SR6	Dionex corp. Sunnyvale, CA, USA
	Xcalibur v. 2.1.0 SP1	Thermo scientific, Rockford, IL, USA
Pumpe	P680	Dionex corp. Sunnyvale, CA, USA

Tabell 4-5 Utstyr til trippelkvadrupol

Utstyr	Modell	Leverandør
Autosampler/-injektor	WPS-3000TRS	Dionex corp. Sunnyvale, CA, USA
Detektor	TSQ Quantum Access	Thermo scientific, Rockford, IL, USA
Programvare	Chromeleon v. 6.80 SR6	Dionex corp. Sunnyvale, CA, USA
	Xcalibur v. 2.0.7 SP1	Thermo scientific, Rockford, IL, USA
Pumpe	LPG-3400M	Dionex corp. Sunnyvale, CA, USA

Tabell 4-6 Øvrig utstyr; ikke-forbruksmateriell

Utstyr	Modell	Produsent
Automatpipette	Finnpipette®	Thermo electron corp. Cheshire, UK
	BIOHIT	Biohit Oyj, Helsinki, Finland
Inkubatorovn	ED 53	BINDER Inc, Bohemia, NY USA
Magnetstativ	DynaMag™-2 Magnet	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
pH-meter	Beckman φ110 ISFET pH Meter	Beckman, USA
	827 pH lab	Metrohm AG, Herisau, Sveits
Prøveblander	HulaMixer™	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Prøveblander med varme	Thermomixer comfort/compact 1,5 ml	Fisher Scientific, Oslo, Norge
Sentrifuge	Centrifuge 5804	Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland
	Kinetic energy 25 Joules Galaxy Mini centrifuge	VWR International, Leuven, Belgia
Ultralydbad	Ultrasonic Cleaner	VWR International, Leuven, Belgia
Vannrenseanlegg	Milli-Q Centry Systems	EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA
Vekt	XS205 DualRange	Mettler-Toledo, Oslo, Norge
Vortex-mikser	IKA® MS3 digital	IKA Works inc., Wilmington, NC, USA

Tabell 4-7 Øvrig utstyr; forbruksmateriell

Utstyr	Modell	Produsent
Eppendorfrør, LoBind (for proteiner)	Protein LoBind tube 1,5 mL og 2,0 mL	Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland
Korker til vialer	Hvite	Holger teknologi, Oslo, Norge
Magnetiske kuler	Dynabeadskuler [®] M-280, tosyllaktivert	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Micro-Insert	31x6 mm, 0,1 mL, clear glass	VWR International, Leuven, Belgia
Pasteurpipetter i glass	230 mm	VWR International, Leuven, Belgia
Pipettespisser	Finntip [®]	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
	BIOHIT	Biohit Oyj, Helsinki, Finland
Sentrifugerør	15 mL med skrukork	VWR International, Leuven, Belgia
Vialer	32x11,6 mm	Matriks kjemisk teknologi, Oslo, Norge

4.2 Tillaging av løsninger

4.2.1 Løsninger

20 mM maursyre

En målekolbe fylles nesten full med ionebyttet vann. 755 µL konsentrert maursyre tilsettes og kolben fylles deretter med ionebyttet vann til 1 L.

10 % maursyre

10 µL konsentrert maursyre løses i 90 µL ionebyttet vann.

0,1 % maursyre

En målekolbe fylles nesten full med ionebyttet vann. 100 µL konsentrert maursyre tilsettes og kolben fylles deretter med ionebyttet vann til 10 mL.

50 mM ABC-buffer

Bufferen ble laget ny hver dag.

39,53 g tørrstoff veies ut og løses i 10 mL ionebyttet vann.

Standardløsninger

For alle standardene ble det laget standardløsninger med konsentrasjon 10 µg/mL. Løsningene ble oppbevart i fryser.

Rekombinant γ -enolase

7,5 µL stamløsning (1,33 mg/mL) ble tilsatt 992,5 µL 50 mM ABC-buffer.

Endogent γ -enolase

Scripps – 30 µL stamløsning (0,333 mg/mL) ble tilsatt 970 µL 50 mM ABC-buffer.

Hy-Test – 13,5 µL stamløsning (0,740 mg/mL) ble tilsatt 986,5 µL 50 mM ABC-buffer.

Rekombinant α -enolase

10 µL stamløsning (1 mg/mL) ble tilsatt 990 µL 50 mM ABC-buffer.

Intern standard

Til en vial med 1 nmol intern standard (IS) ble det tilsatt 20 µL 10 % maursyre. Peptidet ble ristet til fullstendig løst. En stamløsning (5000 pmol/µL) ble laget ved å tilsettes 180 µL 0,1 % maursyre til vialen. Løsningen ble videre fortynnet til løsning A (100 nM) ved å ta ut 20 µL stamløsningen og tilsette 980 µL 0,1 % maursyre. Løsning B (50 nM) ble laget ved å ta ut 500 µL løsning A og tilsette 500 µL 0,1 % maursyre. Løsning B ble oppbevart i fryser i porsjoner på 330 µL.

4.2.2 Prøvematriks

Serum

Humant serum fra Ullevål sykehus ble dispensert i passende porsjoner og oppbevart i fryser.

5 % BSA-løsning

Løsningen ble laget samme dag som den skulle brukes.

For hver mL 5 % BSA-løsning veies det ut 50 mg BSA-tørrstoff som løses i 1*PBS-løsning.

4.2.3 Løsninger til immunoekstraksjon

10*PBS-løsning

8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ og 0,240 g KH_2PO_4 veies ut og løses i 100 mL ionebyttet vann.

Løsningen ble oppbevart i romtemperatur i inntil 3 måneder.

1*PBS-løsning

10 mL 10*PBS-løsning overføres til en målekolbe og tilsettes ionebyttet vann til 100 mL.

Løsningen ble oppbevart i kjøleskap i inntil 3 måneder.

1*PBS-løsning m/0,05 % Tween[®] 20

50 μL Tween[®] 20 og 10 mL 10*PBS-løsning overføres til en målekolbe og tilsettes ionebyttet vann til 100 mL.

Tween[®] 20 er meget viskøs og kan være problematisk å få ut av pipetten. Pipettespissen fylles derfor med et overskudd av Tween[®] 20, pipettespissen tørkes av og angitt volum tilsettes løsningen ved å trykke frem til pipetten gir motstand.

Løsningen ble oppbevart i kjøleskap i inntil 3 måneder.

10 mM Tris-HCl-løsning

121,8 mg Tris tilsettes en målekolbe. Målekolben fylles halvfull med ionebyttet vann og pH justeres til 7,4 med en løsning som består av HCl og vann i forholdet 1:7. Deretter tilsettes ionebyttet vann til 100 mL.

Løsningen ble oppbevart i kjøleskap i inntil 3 måneder.

4.2.4 Løsninger til tryptisk proteolyse

Reduksjonsreagens

Utveid tørrstoff ble oppbevart i kjøleskap og løsningene ble laget rett før bruk.

50 mM DTT-løsning: 7,71 mg tørrstoff veies ut og løses i 1 mL 50 mM ABC-buffer.

100 mM DTT-løsning: 7,71 mg tørrstoff veies ut og løses i 500 µL 50 mM ABC-buffer.

Alkyleringsreagens

Utveid tørrstoff ble oppbevart mørkt i fryser og løsningene ble laget rett før bruk.

200 mM IAA-løsning: 37,19 mg tørrstoff veies ut og løses i 1 mL 50 mM ABC-buffer.

400 mM IAA-løsning: 37,19 mg tørrstoff veies ut og løses i 500 µL 50 mM ABC-buffer.

Trypsin

Utveid tørrstoff ble oppbevart i fryser og løsningene ble laget rett før bruk.

1 mg/mL trypsin-løsning: 1 mg tørrstoff veies ut og løses forsiktig i 1 mL 50 mM ABC-buffer.

50 µg/mL trypsin-løsning: 50 µL 1 mg/mL trypsin-løsning tilsettes 950 µL 50 mM ABC-buffer. Løsningen blandes forsiktig.

5 µg/mL trypsin-løsning: 100 µL 50 µg/mL trypsin-løsning tilsettes 900 µL 50 mM ABC-buffer. Løsningen blandes forsiktig.

4.2.5 Mobilfaser

Det ble benyttet fire mobilfaser i denne oppgaven. Mobilfase A bestod av 99 % 20 mM maursyre og 1 % ACN, mobilfase B bestod av 99 % ACN og 1 % 20 mM maursyre, mobilfase C bestod av 50 % ACN og 50 % ionebyttet vann og mobilfase D bestod av 95 % ionebyttet vann og 5 % metanol.

Mobilfase A: 1 L 20 mM maursyre lages som beskrevet over. 10 mL tas ut og erstattes med 10 mL ACN.

Mobilfase B: 1 L ACN måles opp i en målekolbe. 10 mL tas ut og erstattes med 10 mL 20 mM maursyre.

Mobilfase C: 500 mL ACN tilsettes en målekolbe. Ionebyttet vann tilsettes til 1 L.

Mobilfase D: 950 mL ionebyttet vann tilsettes en målekolbe. Metanol tilsettes til 1 L.

Løsningene blandes godt og settes på ultralydbad i 5-10 min for å fjerne eventuelle luftbobler.

5 Metoder

5.1 *In-solution*-proteolyse av standarder

I metoden beskrevet under er volumene beregnet for proteolyse av 500 μL 100 ng/mL α - eller γ -enolase i 50 mM ABC-buffer. Metoden ble benyttet for proteolyse av alle standardene.

1. 2,5 μL 50 mM DTT-løsning tilsettes og prøven ristes på prøveblander i 20 minutter ved 60 °C.
2. Prøven avkjøles til romtemperatur.
3. 2,5 μL 200 mM IAA-løsning tilsettes og prøven settes mørkt i 15 minutter.
4. 5 μL trypsin (5 $\mu\text{g/mL}$) tilsettes og prøven settes til proteolyse over natt, i inkubatorovn ved 37 °C.

5.2 Prøveopparbeidelse for NSE i serum og 5 % BSA

5.2.1 Vask av kuler

1. Ønsket volum kuleløsning (1 mg/mL) overføres til et eppendorfrør som settes på magnetstativet.
2. Løsningen fjernes forsiktig.
3. Eppendorfrøret tas av magnetstativet og kulene vaskes med 1 mL 1*PBS-løsning m/0,05 % Tween[®] 20.
4. Røret settes tilbake på magnetstativet og løsningen fjernes forsiktig.
5. Kulene resuspenderes i 50 mM ABC-buffer i samme volum som ble tatt ut i punkt 1.

5.2.2 Immunoekstraksjon

1. 20 μ L kuleløsning fra punkt 5 over tilsettes hver prøve. Kuleløsningen gjøres homogen mellom hver andre tilsetting.
2. Prøvene ekstraheres i 60 minutter på prøveblander.
3. Eppendorfrørene settes på magnetstativet og prøveløsningen fjernes forsiktig.
4. Kulene vaskes med:
 - a. 200 μ L 1*PBS-løsning m/0,05 % Tween[®] 20
 - b. 200 μ L 1*PBS-løsning
 - c. 200 μ L 10 mM Tris-HCl-løsning
 - d. 200 μ L 50 mM ABC-buffer

Mellom hvert vasketrinn settes eppendorfrørene på magnetstativet og vaskeløsningen fjernes forsiktig.

5. Kulene resuspenderes i 70 μ L 50 mM ABC-buffer.

5.2.3 Tryptisk proteolyse

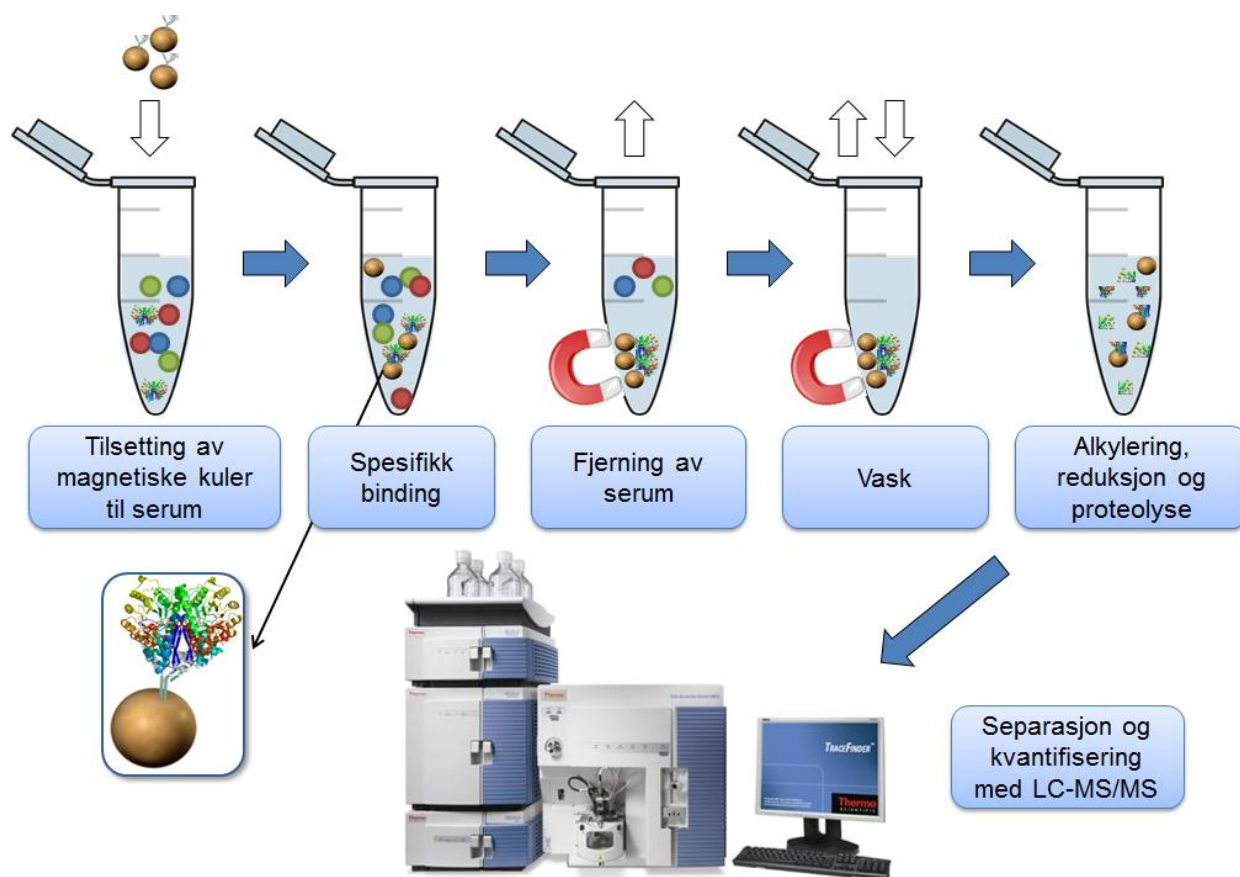
Eppendorfrørene som inneholder 70 μ L løsning står nå på magnetstativet.

1. 5 μ L 100 mM DTT-løsning tilsettes og prøvene ristes på prøveblander i 20 minutter ved 60 °C.
2. Prøvene avkjøles til romtemperatur.
3. 5 μ L 400 mM IAA-løsning tilsettes og prøvene settes mørkt i 15 minutter.
4. 10 μ L trypsin-løsning (50 μ g/mL) tilsettes og prøvene settes til proteolyse over natt, på prøveblander ved 37 °C.

5.2.4 Klargjøring av prøver for analyse

1. Prøvene avkjøles til romtemperatur.
2. 10 μ L IS tilsettes.
3. Prøvene sentrifugeres før de settes på magnetstativet.
4. Løsningen overføres til nye eppendorfrør, som igjen sentrifugeres.
5. 60 μ L prøveløsning overføres til vialer. Uttaket fra prøven gjøres fra supernatanten.

Figur 5-1 viser en skjematisk oversikt over trinnene i prøveopparbeidelsen og kvantifiseringen av NSE i serum.



Figur 5-1 Skjematisk oversikt over prøveopparbeidelse og kvantifisering av NSE i serum.

5.3 LC-MS/MS-analyse av NSE

Det ble benyttet to analyseapparater, lineær ionefelle og trippelkvadrupol. Lineær ionefelle ble benyttet i innledende forsøk for å identifisere spesifikke peptider. Deretter ble trippelkvadrupol benyttet for utvikling og optimalisering av en SRM-metode for kvantifisering av NSE. Til hvert av apparatene ble det benyttet ulike HPLC- og MS-metoder. Disse metodene er beskrevet under.

5.3.1 HPLC-parametere

Følgende HPLC-parametere var de samme, uavhengig av hvilket apparat som ble benyttet:

Mobilfase A:	99 % 20 mM maursyre, 1 % ACN
Mobilfase B:	1 % 20 mM maursyre, 99 % ACN
Kolonne:	AQUASIL C18 50×1 mm i.d., 3 µm partikkeldiameter
Forkolonne:	AQUASIL C18 10x1 mm i.d., 5 µm partikkeldiameter
Injeksjonsvolum:	40 µL

Lineær ionefelle

Under analysen ble mobilfase A og B benyttet. Gradientelueringen startet med 100 % mobilfase A med flowhastighet 40 µL/min i ett minutt. Deretter økte andel mobilfase B fra 0 til 85 % i løpet av de neste 29 minuttene med uendret flowhastighet. Denne 15:85-fordelingen ble kjørt i ett minutt før kolonnen ble rekondisjonert med 100 % mobilfase A i 14 minutter med synkende flowhastighet. Rekondisjoneringen tilsvarte i overkant av 15 kolonnevolum.

For å unngå unødvendig å kjøre forurensninger inn i massespektrometeret ble de første fire og de siste fire minuttene kjørt til waste. Tabell 5-1 viser en oversikt over gradientelueringen benyttet ved analyse på lineær ionefelle.

Tabell 5-1 Gradientelueringen benyttet ved analyse på lineær ionefelle.

Tid (min)	Mobilfase A (%)	Mobilfase B (%)	Flow (µL/min)
0	100	0	40
1	100	0	40
30	15	85	40
31	100	0	80
45	100	0	50

Trippelkvadрупol

Ved analyse på trippelkvadрупol ble det benyttet kolonneovn som holdt en temperatur på 30 °C.

Under analysen ble mobilfase A og B benyttet. Analysen startet med 100 % mobilfase A i ett minutt. Deretter ble andelen mobilfase B økt fra 0 til 85 % i løpet de neste 29 minuttene. Flowhastigheten ble holdt konstant 40 µL/min under hele analysen.

I den endelige LC-MS/MS-metoden ble de 16 første og de to siste minuttene kjørt til waste. Tabell 5-2 viser en oversikt over gradientelueringen som ble benyttet ved analyse på trippelkvadрупol.

Tabell 5-2 Gradientelueringen benyttet ved analyse på trippelkvadрупol.

Tid (min)	Mobilfase A (%)	Mobilfase B (%)	Flow (µL/min)
0	100	0	40
1	100	0	40
30	15	85	40

Mellom hver analyse ble det kjørt et vaskeprogram for å fjerne eventuelle rester av analytt og forurensinger på kolonnen og for å rekondisjonere kolonnen før neste analyse. I dette vaskeprogrammet ble mobilfase A, B og C benyttet. Programmet startet med 75 % mobilfase A, 15 % mobilfase B og 10 % mobilfase C, med en flowhastighet på 45 µL/min, i et halvt minutt. Flowhastigheten ble deretter økt til 55 µL/min med en mobilfase som bestod av 90 % mobilfase B og 10 % mobilfase C. Dette ble kjørt i tre minutter. Flowhastigheten ble så økt til 65 µL/min i 0,2 minutter. Kolonnen ble deretter rekondisjonert med 100 % mobilfase A i omtrent 10 minutter med synkende flowhastighet. Rekondisjonen tilsvarte i overkant av

15 kolonnevolum. Tabell 5-3 viser en oversikt over vaskeprogrammet som ble benyttet mellom analysene på trippelkvadrupol.

Tabell 5-3 Vaskeprogrammet benyttet på trippelkvadrupol.

Tid (min)	Mobilfase A (%)	Mobilfase B (%)	Mobilfase C (%)	Flow (µL/min)
0	75	15	10	45
0,5	0	90	10	55
3,5	0	90	10	65
3,7	100	0	0	70
14	100	0	0	60
17	100	0	0	50
17,5	100	0	0	10

5.3.2 MS-parametere

Lineær ionefelle

Ionisering: ESI, Positiv mode

Kapillærtemperatur: 275 °C

Forstøvergass: Nitrogen (N₂)

Forstøvergasshastighet: 9 units

Tørkegass: Nitrogen (N₂)

Tørkegasshastighet: 5-10 units

CID-energi: 35 V

Kollisjonsgass: Helium (He)

Deteksjon av spesifikke peptider på lineær ionefelle ble gjort med *full scan* i området m/z 250-1500. Parallelt ble det gjort *datadependent MS/MS-scan* for peptidene som hadde signalintensitet over $1,0 \times 10^5$.

Trippelkvadrupol

Ionisering:	ESI, Positiv mode
Kapillærtemperatur:	270 °C
Forstøvergass:	Nitrogen (N ₂)
Forstøvergassstrykk:	15 units
Tørkegass:	Nitrogen (N ₂)
Tørkegasshastighet:	5-10 units
CID-energi:	14-21 V
Kollisjons-gass:	Argon (Ar)
Kollisjons-gassstrykk:	1,7 mTorr
Scanintervall:	0,3 sek/scan

Under utviklingen av den endelige SRM-metoden ble det benyttet *selected ion monitoring* (SIM), *precursor ion scan* og *product ion scan*. Den endelige SRM-metoden er en såkalt EZ-metode. Til forskjell fra vanlige SRM-metoder trenger man her ikke å definere segmenter for grupper av overganger. I EZ-metoden velger man ved hvilken tid scanningen av de ulike SRM-overgangene skal starte og stoppe, og disse tidsperiodene kan overlappe i større eller mindre grad. Den endelige SRM-metoden er gjengitt i tabell 5-4.

Tabell 5-4 SRM-metoden for analyse av NSE på trippelkvadrupol.

Isoform	Aminosyresekvens	m/z (Q1)	m/z (Q3)	Kollisjons-energi (V)	Starttid (min)	Stopptid (min)
α	TIAPALVSK	450,56	614,42 658,42	16	17,06	19,06
γ	ELPLYR	395,70	274,66 548,32	14	17,77	19,77
γ	GNPTVEVDLYTAK	704,00	260,20 373,28	20	18,73	20,73
α	GNPTVEVDLFTSK	704,29	618,33 710,37	21	20,02	22,02

5.4 Databaser og dataverktøy

Innledningsvis i oppgaven ble det benyttet ulike databaser for å identifisere spesifikke peptider for α - og γ -enolase. I tillegg ble dataverktøy benyttet for deteksjon av peptider etter LC-MS/MS-analyse og ved behandling av eksperimentelle data. De ulike databasene og dataverktøyene presenteres her.

5.4.1 The Universal Protein Resource (UniProt)

UniProt (<http://www.uniprot.org/>) er en omfattende database fritt tilgjengelig på internett. Databasen inneholder informasjon om blant annet proteinsekvenser og proteinenes biologiske funksjon. I denne oppgaven ble databasen benyttet for å finne proteinsekvensene til α - og γ -enolase.

5.4.2 ProteinProspector

ProteinProspector (<http://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm>) ble brukt for å generere *in silico*-peptider med tilhørende m/z -verdier for proteiner etter tryptisk proteolyse. Programmet er fritt tilgjengelig på internett og i denne oppgaven ble programmets versjon 5.10.0 benyttet for både α - og γ -enolase.

Søket gjøres på følgende måte:

1. Velg MS-digest
2. Under Database velges SwissProt.2011.10.10
3. Under *Digest* velges *Trypsin*
4. Maksimalt antall utelatte klipp settes til 0, under *Max. Missed Cleavages*
5. Under *Constant Mods* velges *Carboxymethyl (C)*
6. Eventuell merking ved *Variable Mods* fjernes
7. ID-nummeret for peptidet legges inn under *List of Entries*
 - a. P06733 og P09104 for henholdsvis α - og γ -enolase

8. Legg inn ønsket intervall for m/z -verdier under *Peptid Mass* (f.eks. 250-1500)
9. Legg inn minimum antall aminosyrer i peptidkjeden under *Min Peptide Length* (f.eks. 5)
10. Hak av for *Report Multiple Charges*
11. Trykk *Perform Digest*

Resultatet presenteres i en rapport bestående av aminosyresekvensene til de tryptiske peptidene med tilhørende m/z -verdier for de ulike ladningene peptidene kan ha. I tillegg kan man få oppgitt m/z -verdiene til b- og y-fragmentene som genereres ved CID i MS/MS-eksperimenter.

5.4.3 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome) er en algoritme som sammenlikner primærsekvensene til biologiske substanser, for eksempel aminosyresekvensen til peptider. BLAST ble i denne oppgaven benyttet for å sammenlikne tryptiske peptider fra både α - og γ -enolase, med andre peptider i databasen og på denne måten finne peptider som var spesifikke for proteinet og som dermed kunne være potensielle signaturpeptider.

Søket gjøres på følgende måte:

1. Velg *protein blast*
2. Skriv inn den aktuelle peptidsekvensen under *Enter accession number(s)* (f.eks. *ELPLYR*)
3. Velg organismer det skal søkes i, under *Organism* (f.eks. *Human, Mouse, Bovine*)
4. Trykk *BLAST*

Resultatet oppgis i form av ulike statistiske parametere:

- *Bit score* gir en indikasjon på hvor spesifikk aminosyresekvensen er for peptidet. Høy verdi indikerer høy spesifisitet.

- *E-verdi* er sannsynligheten for at aminosyresekvensen forekommer i peptidet ved en tilfeldighet. Jo lavere denne verdien er, jo mer signifikant er resultatet.
- *Aminosyredekning* angir hvor mange aminosyrer i peptidet som korrelerer med aminosyresekvensen til peptidet.

5.4.4 Proteome Discoverer

Proteom Discoverer er et verktøy for proteomisk dataanalyse. Programmet er en veletablert søkemotor fra Thermo Scientific som ved hjelp av søk i ulike databaser identifiserer proteiner og deres proteolytiske peptider basert på eksperimentelle data.

5.4.5 Behandling av eksperimentelle data i Xcalibur

Xcalibur er et windowsbasert datasystem som brukes til å styre alle Thermo Scientifics massespektrometre og for å behandle eksperimentelle data. Et av programmene i Xcalibur kan automatisk detektere peptider og bestemme deres konsentrasjon i prøven. Med *Processing Setup* lager man en metode som instruerer Xcalibur i hvordan de eksperimentelle dataene skal behandles og resultatene presenteres i en rapport i *Quan Browser*.

Programmet ble brukt i deler av oppgaven for å bestemme signalintensiteten til peptidene og for å beregne konsentrasjonen av proteinene i prøven.

5.5 Validering

5.5.1 Prøvematriks

Metoden ble validert med surrogatmatriks (5 % BSA). Serum ble inkludert i de forsøkene hvor dette var mulig og relevant. Det ble i alle forsøkene benyttet 1 mL prøvemateriale og standardprøvene i 5 % BSA ble laget rett før bruk.

5.5.2 Bruk av intern standard

Det ble benyttet IS i alle forsøkene. IS var en syntetisk isotopanalogue av signaturpeptidet $\gamma 16$ og ble tilsatt alle prøvene før analyse på LC-MS/MS.

5.5.3 Nøyaktighet

Nøyaktigheten ble bestemt ved tre relevante konsentrasjoner, 10, 100 og 500 ng/mL, med fem paralleller av hver konsentrasjon. Konsentrasjonen til analytten ble bestemt ut ifra kalibreringskurven som ble laget samme dag som analysen ble gjort.

5.5.4 Presisjon

Metodens intra- og interdag presisjon ble bestemt ved tre relevante konsentrasjoner, 10, 100 og 500 ng/mL. Intradag ble bestemt med 5 paralleller, mens interdag ble bestemt med tre paralleller for hver konsentrasjon. Interdagforsøkene ble gjort over fem dager. Konsentrasjonen til analytten ble bestemt ut ifra kalibreringskurven som ble laget samme dag som analysen ble gjort.

5.5.5 Kalibreringskurve og linearitet

Kalibreringskurven ble laget ved å analysere en serie prøver med kjent konsentrasjon. γ -enolase (Scripps) ble tilsatt 5 % BSA i konsentrasjonene 5, 10, 30, 100 og 500 ng/mL. Konsentrasjonene 10, 100 og 500 ng/mL hadde fem paralleller, mens konsentrasjonene 5 og 30 ng/mL hadde to paralleller. Det gjennomsnittlige forholdet mellom signalintensiteten til analytten og signalintensiteten til IS ble plottet mot tilsatt konsentrasjon av γ -enolase (Scripps), og det ble trukket en lineær tilpasset linje (kalibreringskurve) ut ifra de observerte dataene. Denne linjen beskrives med likningen $y=ax+b$ og regresjonskoeffisienten r^2 . Kalibreringskurven beskriver metodens linearitet i det aktuelle konsentrasjonsområdet.

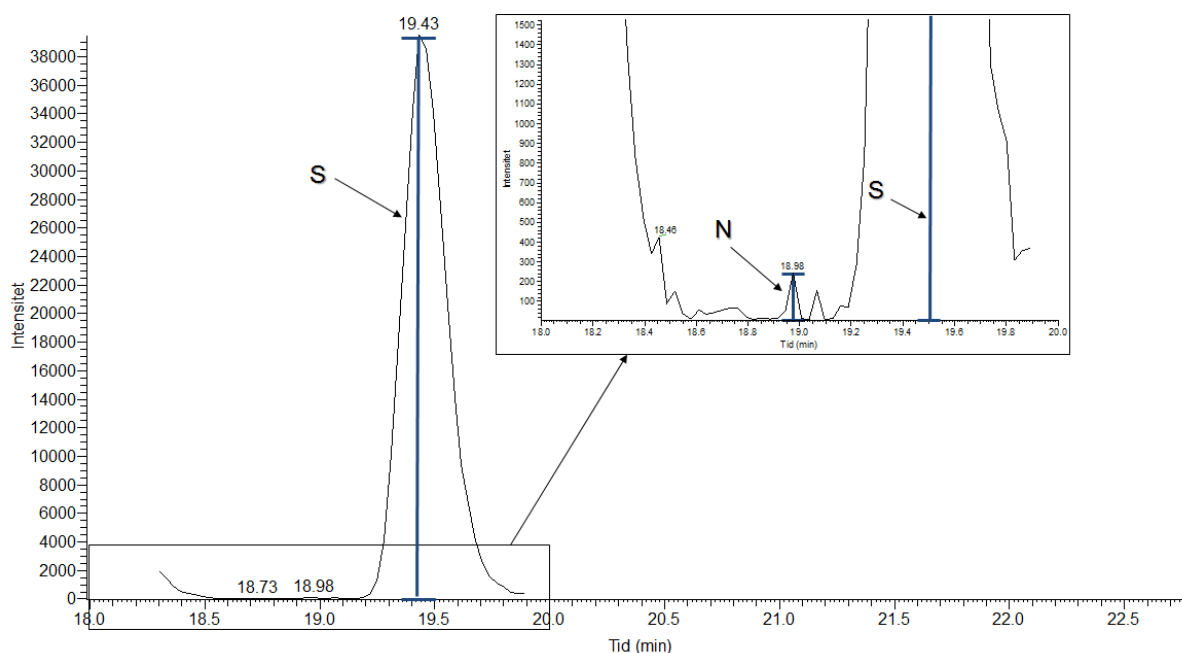
5.5.6 Deteksjonsgrense og nedre kvantifiseringsgrense

Metodens deteksjonsgrense (LOD) og nedre kvantifiseringsgrense (LLOQ) ble estimert ved å benytte signal-støy-forholdet (S/N) ved den laveste konsentrasjonen (5 ng/mL) i kalibreringskurven. For LOD skulle signalet til analytten være mer enn tre ganger så høyt som signalet til støyen. For LLOQ skulle signalet til analytten skal være mer enn ti ganger så høyt som signalet til støyen. LOD og LLOQ ble beregnet på følgende måte:

$$LOD = \frac{C}{\left(\frac{S}{3 \cdot N} \right)} \quad (1)$$

$$LLOQ = \frac{C}{\left(\frac{S}{10 \cdot N} \right)} \quad (2),$$

hvor C er konsentrasjonen, S er signalet til analytten og N er signalet til støyen (figur 5-2).



Figur 5-2 Avlesning av S og N for estimering av LOD og LLOQ.

5.5.7 Utbytte

Metodens utbytte ble bestemt ved tre relevante konsentrasjoner, 10, 100 og 500 ng/mL, med tre paralleller for hver konsentrasjon. Ni prøver med 1 mL 5 % BSA tilsatt γ -enolase (Scripps) i konsentrasjonene nevnt over, ble ekstrahert sammen med ni prøver med 1 mL 5 % BSA som ikke var tilsatt γ -enolase (Scripps) (100 %-prøver). Etter ekstraksjonen ble 100 %-prøvene tilsatt γ -enolase (Scripps) i konsentrasjoner som tilsvarte 10 ganger oppkonsentrering av de prøvene som var tilsatt γ -enolase (Scripps) før ekstraksjonen. Dette tilsvarte 0,1, 1 og 10 μ g/mL. Deretter ble alle prøvene proteolysert og analysert. Ekstraksjonsutbyttet ble beregnet ved å sammenlikne gjennomsnittlig signalintensitet til prøvene som var tilsatt γ -enolase (Scripps) før immunoekstraksjonen med den gjennomsnittlige signalintensiteten til 100 %-prøvene.

5.5.8 Stabilitet

Stabiliteten ble testet ved tre ulike oppbevaringsbetingelser: ved oppbevaring i romtemperatur, fryser og autosamplers.

Stabiliteten til analytt i matriks

Stabilitet i romtemperatur

Prøver som hadde stått på benken i minimum fire timer ble sammenliknet med prøver som var nylaget. Alle prøvene ble immunoekstrahert og proteolysert som beskrevet i 5.2. Forsøket ble gjort på 5 % BSA tilsatt γ -enolase (Scripps) i konsentrasjonene 10, 100 og 500 ng/mL og på uspiket serum. Alle prøvene hadde tre paralleller.

Fryse-tine stabilitet

Prøver som inneholdt 5 % BSA tilsatt γ -enolase (Scripps) i tre konsentrasjoner og serumprøver, ble fryst 1, 2 og 3 ganger. Prøvene ble oppbevart i fryseren i minimum fire timer ved hver fryse-tinesyklus. Da prøvene skulle tine sto de på benken i romtemperatur til de var bruksklare, dvs. fullstendig tint. Prøvene som hadde vært fryst ble sammenliknet med prøvene som var nylaget. Forsøket ble gjort på 5 % BSA tilsatt γ -enolase (Scripps) i konsentrasjonene 10, 100 og 500 ng/mL og uspiket serum. Alle prøvene hadde tre paralleller.

Stabiliteten til analytt i ekstrakt

Det ble undersøkt hvor godt analytten tålte å bli oppbevart i ekstraktet i autosamplern i henholdsvis 0, 12, 24 og 36 timer. *In-solution*-klippet γ -enolase (Scripps) i konsentrasjonene 30 og 100 ng/mL ble analysert, med tre paralleller for hver konsentrasjon. Kjølingen til autosamplern var ute av drift i perioden da valideringen ble gjort og prøvene stod derfor i romtemperatur (~20 °C).

5.5.9 Selektivitet

Det ble analysert fire blanke prøver av 5 % BSA for å undersøke om BSA inneholdt stoffer som gir interfererende toppe med γ 16 og IS.

6 Resultater og diskusjon

6.1 Kartlegging av potensielle signaturpeptider

Valg av signaturpeptid(er) er det mest kritiske steget i utvikling av kvantitativ analysemetode for et protein [6]. Peptidet skal fungere som et surrogat for proteinet og må derfor representere det på alle mulige måter. Peptidet må være unikt for proteinet og må i dette tilfellet kunne detekteres på MS. Det vil si at peptidet ikke må være for lite, slik at det er lite sannsynlig at andre proteiner også generer samme peptid ved tryptisk proteolyse, og det må ha en m/z -verdi som er innenfor det masseanalysatoren kan analysere. Samtidig var det også ønskelig at signaturpeptidene ikke skulle inneholde aminosyrer som har potensiale for post-translasjonsmodifikasjon (PTM), for eksempel cystein, metionin og tryptofan [6]. PTMer kan gjøre det vanskelig å få reproducerbare målinger av peptidet, noe som er helt avgjørende for en god kvantitativ metode [6]. Peptidene måtte også være fullstendig proteolysert for god reproducerbarhet og for γ -enolase kunne ikke signaturpeptidene være blant aminosyrene 416 til 433 da disse er en del av bindingssete for antistoff E21. Det var ønskelig å finne to signaturpeptider for hvert protein, et for kvantitativ måling og et for kvalitativ sikkerhet.

6.1.1 Identifisering av spesifikke peptider

Det ble først utført en *in silico*-trypsinering ved hjelp av ProteinProspector (5.4.2). Dette ga en oversikt over alle peptider α - og γ -enolase kunne generere ved tryptisk proteolyse. Alle peptidene som bestod av fem eller flere aminosyrer ble undersøkt for spesifisitet i BLAST (5.4.3). Det ble funnet 20 spesifikke peptider for α -enolase og 18 spesifikke peptider for γ -enolase. Oversikt over de tryptiske peptidene er presentert i appendiks 1 og 2.

6.1.2 Deteksjon av potensielle signaturpeptider

α - og γ -enolase er to store proteiner som genererer mange tryptiske peptider. For å lette arbeidet ble det fokusert på kun å detektere de spesifikke peptidene.

Separate *in-solution*-proteolyser av α - og γ -enolase med konsentrasjon på henholdsvis 5 og 10 $\mu\text{g/mL}$ ble analysert på lineær ionefelle i *full scan*-modus. Målet med analysen var å detektere spesifikke peptider. MS-dataene ble først analysert med Proteom Discoverer (5.4.4) og deretter ble de identifiserte peptidene manuelt kontrollert ved hjelp av MS/MS-spektra i

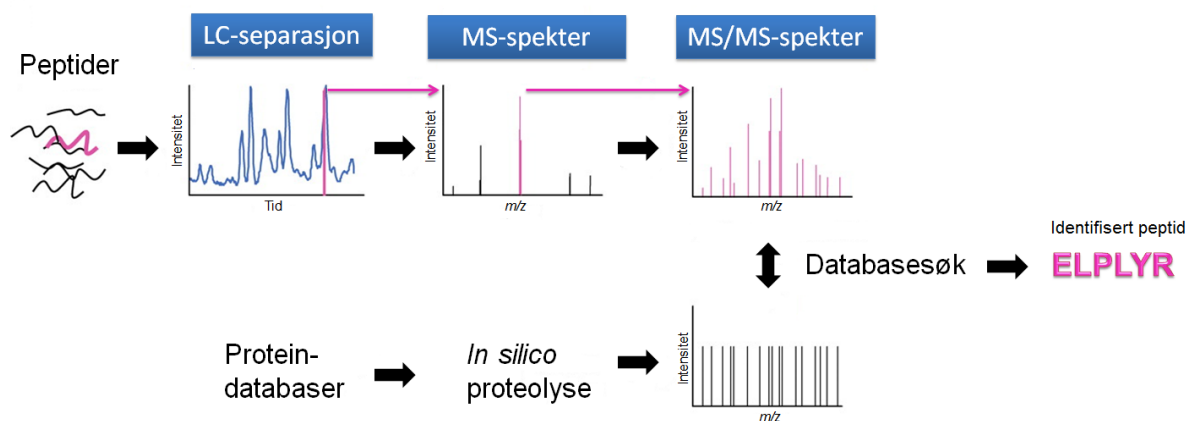
Xcalibur (5.4.5). Det ble detektert 13 og 9 spesifikke peptider for henholdsvis α - og γ -enolase. Detekterte peptider er presentert i tabell 6-1 og 6-2.

Tabell 6-1 Oversikt over de spesifikke peptidene for α -enolase, med tilhørende m/z-verdier og signalintensitet, som ble detektert ved analyse av α -enolase i konsentrasjon 5 $\mu\text{g/mL}$ på lineær ionefelle.

Tryptisk peptid- nummer	Aminosyresekvens	m/z (ladning)	Signal- intensitet
$\alpha 4$	GNPTVEVDLFTSK	704,79 (+2)	$6,3 \cdot 10^5$
		1407,57 (+1)	$4,9 \cdot 10^4$
$\alpha 12$	TIAPALVSK	451,06 (+2)	$5,1 \cdot 10^5$
		900,11 (+1)	$6,3 \cdot 10^4$
$\alpha 21$	HIADLAGNSEVILPVPAFNVINGGSHAGNK	753,89 (+4)	$6,9 \cdot 10^4$
		1004,86 (+3)	$4,6 \cdot 10^4$
$\alpha 22$	LAMQEFMILPVGAANFR	955,00 (+2)	$4,7 \cdot 10^4$
		382,44 (+3)	$1,6 \cdot 10^5$
$\alpha 24$	IGAENVYHNLK	573,16 (+2)	$5,6 \cdot 10^4$
		1144,32 (+1)	-
$\alpha 28$	DATNVGDEGGFAPNILENK	982,05 (+2)	$3,2 \cdot 10^5$
$\alpha 29$	EGLELLK	401,98 (+2)	$8,8 \cdot 10^5$
		801,96 (+1)	$1,1 \cdot 10^5$
$\alpha 32$	VVIGMDVAASEFFR	771,91 (+2)	$4,3 \cdot 10^4$
		714,31 (+2)	$1,3 \cdot 10^5$
$\alpha 36$	YISPDQLADLYK	1426,63 (+1)	-
$\alpha 39$	FTASAGIQVVGDDLTVTNPK	1016,64 (+1)	$2,5 \cdot 10^5$
$\alpha 45$	LAQANGWGVMVSHR	509,92 (+2)	$2,0 \cdot 10^5$
		763,39 (+1)	-
$\alpha 50$	YNQLLR	404,47 (+2)	$1,9 \cdot 10^5$
		806,95 (+1)	$1,8 \cdot 10^4$
$\alpha 51$	IEEELGSK	453,50 (+2)	$4,9 \cdot 10^5$
		905,00 (+1)	$8,6 \cdot 10^4$

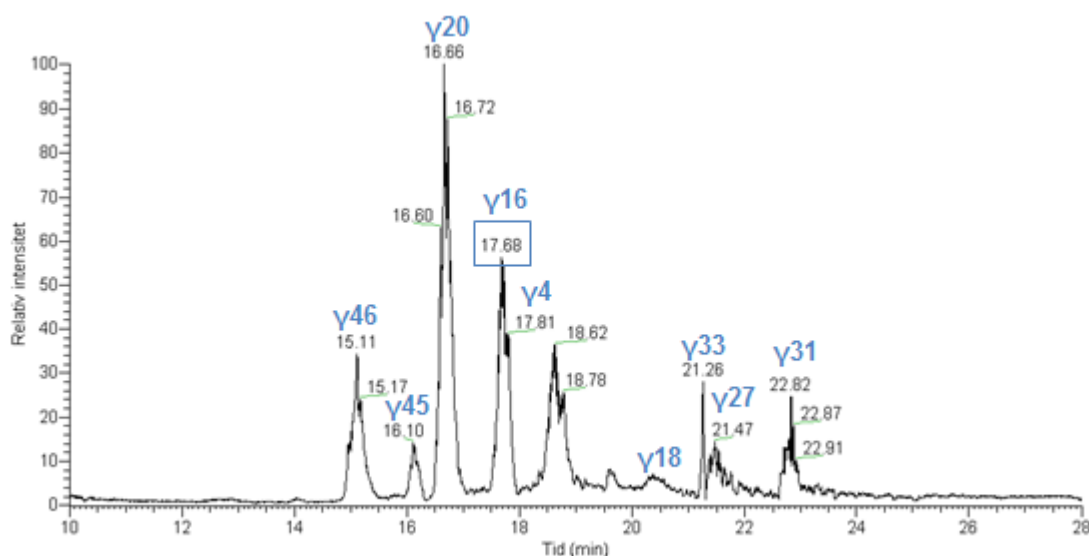
Tabell 6-2 Oversikt over de spesifikke peptidene for γ -enolase, med tilhørende m/z -verdier og signalintensitet, som ble detektert ved analyse av γ -enolase i konsentrasjon 10 $\mu\text{g/mL}$ på lineær ionefelle.

Tryptisk peptid-nummer	Aminosyresekvens	m/z (ladning)	Signal-intensitet
$\gamma 4$	GNPTVEVDLYTAK	703,86 (+2)	$3,2 \cdot 10^5$
		1406,72 (+1)	$1,8 \cdot 10^5$
$\gamma 16$	ELPLYR	395,72 (+2)	$6,0 \cdot 10^4$
		790,45 (+1)	$3,7 \cdot 10^5$
$\gamma 18$	LAMQEFMILPVGAESFR	970,00 (+1)	$3,3 \cdot 10^4$
$\gamma 20$	LGAEVYHTLK	377,54 (+3)	$7,0 \cdot 10^4$
		565,81 (+2)	$6,0 \cdot 10^5$
		1130,62 (+1)	$8,8 \cdot 10^4$
$\gamma 27$	IVIGMDVAASEFYR	785,90 (+1)	$8,5 \cdot 10^4$
$\gamma 31$	YITGDQLGALYQDFVR	929,97 (+2)	$1,5 \cdot 10^5$
$\gamma 33$	FTANVGIIQIVGDDLTVTNPK	1051,56 (+1)	$1,5 \cdot 10^4$
$\gamma 45$	IEEELGDEAR	580,77 (+2)	$6,1 \cdot 10^4$
		1160,54 (+1)	$5,9 \cdot 10^4$
$\gamma 46$	FAGHNFR	283,47 (+3)	$1,3 \cdot 10^4$
		424,71 (+2)	$2,3 \cdot 10^5$
		848,42 (+1)	$4,8 \cdot 10^4$

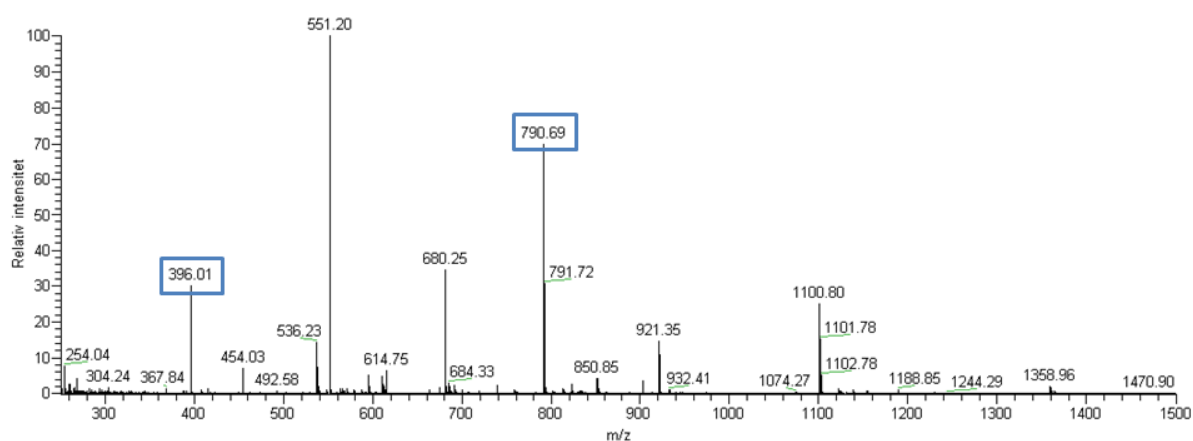


Figur 6-1 Strategi for identifisering av tryptiske peptider ved hjelp av MS/MS-spekter. En blanding av peptider (peptidet av interesse er markert i rosa) separeres med omvendtfasekromatografi. Alle peptidene analyseres først med MS og generer her et MS-spekter. Peptider med signalintensitet over en bestemt verdi fragmenteres videre, og fragmentene analyseres og genererer et MS/MS-spekter. Dette spekteret sammenliknes med et teoretisk MS/MS-spekter som genereres ved in silico-proteolyse. Signifikante resultater rapporteres. Tilpasset fra [44].

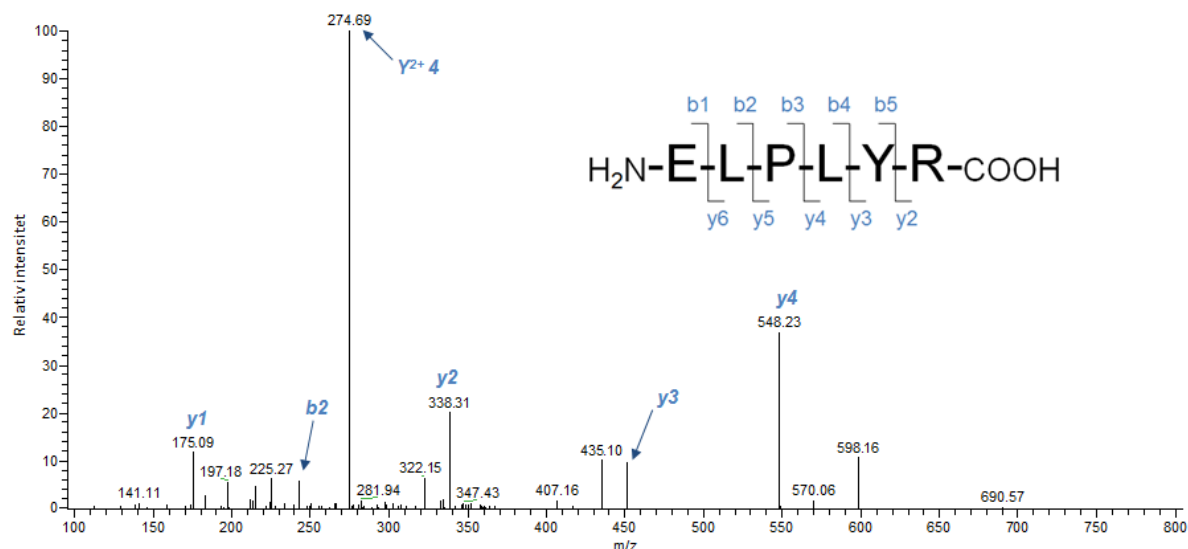
Figur 6-1 viser strategien for identifisering av peptider ved hjelp av MS/MS-spektra. Figur 6-2 til 6-4 viser strategien brukt i praksis for tryptisk peptid nummer 16 for γ -enolase. I figur 6-2 ser man ioneuttrekk av kromatogrammet for en *in-solution*-proteolyse av γ -enolase. Toppen for γ 16 er merket av ved $t_R = 17,68$. Figur 6-3 viser massespektret ved $t_R = 17,68$, hvor m/z -verdiene for γ 16 en og to ganger ladet er markerte. Figur 6-3 viser MS/MS-spekteret for γ 16 en gang ladet ($m/z = 395,7$) ved tiden 17,68. Identifikasjon av b- og y-fragmenter er basert på m/z -verdier hentet i ProteinProspector.



Figur 6-2 Ioneuttrekk av identifiserte spesifikke peptider etter *in solution*-proteolyse av 10 $\mu\text{g/mL}$ γ -enolase, analysert på lineær ionefelle i full scan-modus. De detekterte peptidene er markert med tryptisk peptidnummer.



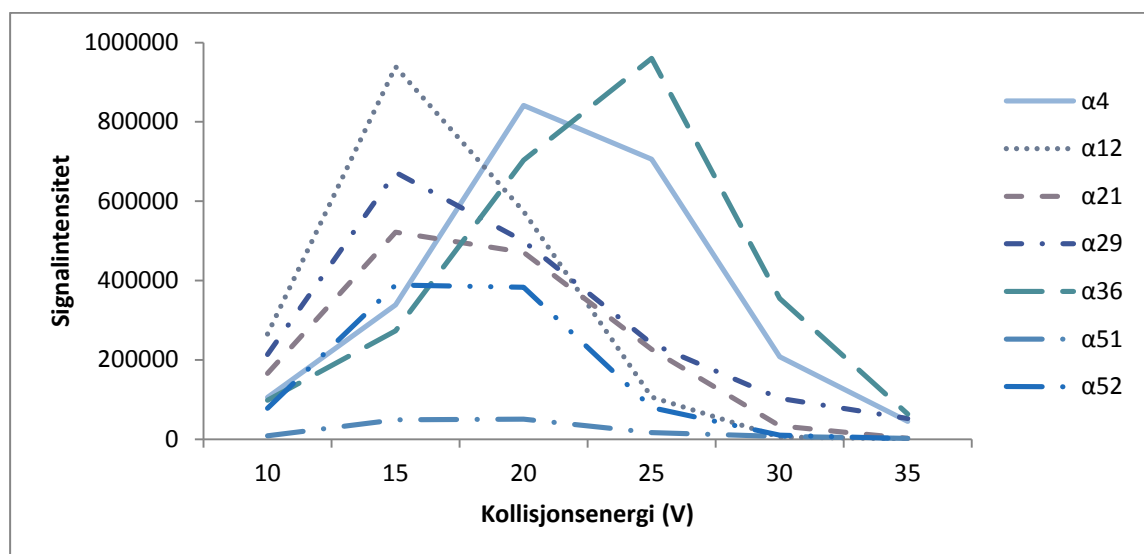
Figur 6-3 MS-spekteret ved $t_R = 17,68$ fra figur 6-2. m/z -verdien for peptidet γ 16, en og to ganger ladet, er markert.



Figur 6-4 MS/MS-spekteret og aminosyresekvens for ELPLYR. Identifiserte b- og y-fragmenter er markert.

6.1.3 Signaturpeptider

Valg av signaturpeptider ble først og fremst basert på signalintensiteten til peptidene, da signalintensiteten er viktig for lavest mulig LLOQ. De 6-7 peptidene som gav høyest signaler i analysen på lineær ionefelle ble undersøkt nærmere på trippelkvadrupol. En *in-solution*-proteolyse av α - og γ -enolase ble analysert med *precursor*- og *product ion scan* for å finne eksakte m/z -verdier for de potensielle signaturpeptidene og deres respektive fragmenter. Disse m/z -verdiene ble brukt videre i test av ulike kollisjonsenergier. Peptider fragmenteres på ulike måter og ideell kollisjonsenergi er ikke den samme for alle. Derfor ble en *in-solution*-proteolyse av α - og γ -enolase analysert i *full scan*-modus i seks omganger med ulike kollisjonsenergier. Kollisjonsenergiene som ble testet var 10, 15, 20, 25, 30 og 35 V. Figur 6-5 og 6-6 viser signalintensiteten til peptidene som ble monitorert, for henholdsvis α - og γ -enolase.



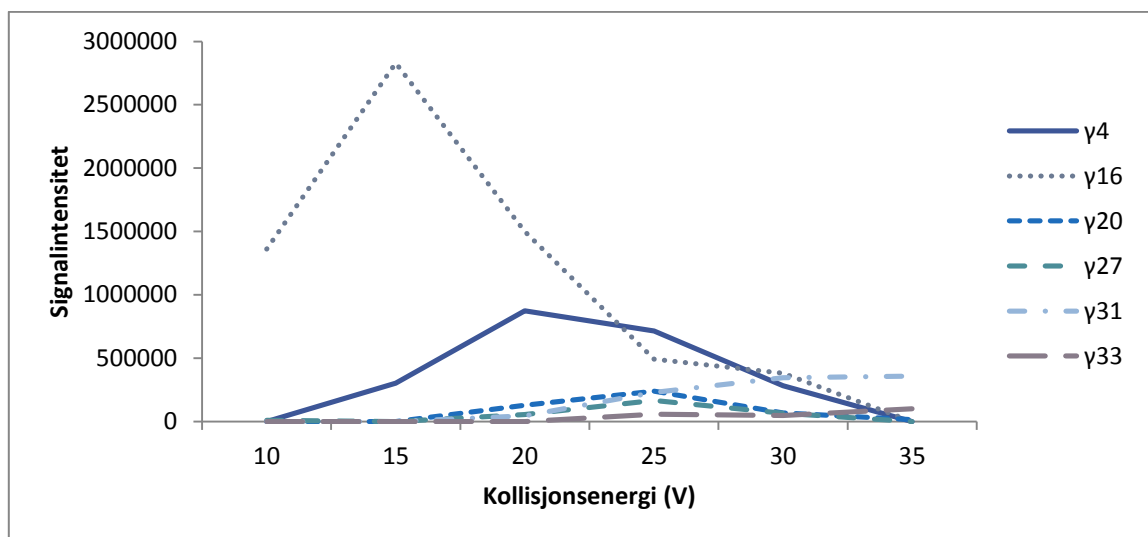
Figur 6-5 Signalintensiteten til sju utvalgte α -peptider analysert i med full scan med seks ulike kollisjonsenergier. Se tabell 6-1 på side 52 for utfyllende informasjon om peptidene.

Flere av α -peptidene hadde veldig lik signalintensitet og det var ikke mulig å velge to signaturpeptider kun basert på dette. Retensjonstiden og m/z -verdien til de høyeste fragmentene ble derfor tatt med i vurderingen. Det er ikke avgjørende, men absolutt en fordel at ikke flere peptider elueres samtidig, da dette kan påvirke MS-resultatene. Metoden skal etter hvert også inkludere kvantifisering av ProGRP, i tillegg til NSE, så det vil være en fordel om signaturepeptidene til ProGRP ikke eluerer samtidig som signaturpeptidene til α - og γ -enolase. Signaturpeptidene til ProGRP har t_R på 15,0, 22,2, og 26,7 minutter [37]. Det var også et ønske om å bruke fragmenter med høyere m/z -verdi enn peptidets egne m/z -verdi, da dette gjør metoden mer selektiv.

Valg av signaturpeptider for α -enolase falt på tryptisk peptid nummer 4 og 12. $\alpha 4$ har aminosyresekvensen "TIAPALVSK", $m/z = 450,56$, $t_R = 20,96$ minutter og peptidet er to ganger ladet. $\alpha 12$ har aminosyresekvensen "GNPTVEVDLFTSK", $m/z = 704,29$, $t_R = 19,84$ og peptidet er to ganger ladet. Ingen av peptidene eluere på samme tidspunkt som signaturpeptidene til ProGRP og begge har fragmenter med høyere m/z -verdi enn peptidets egne m/z -verdi, som er potensielle for en SRM-metode.

To av de tryptiske peptidene for γ -enolase, $\gamma 4$ og $\gamma 16$, skilte seg ut med hensyn på signalintensitet. Ingen av peptidene inneholdt aminosyrer som var potensielle for PTM, og de var heller ikke en del av bindingssettet for antistoff E21. $\gamma 4$ og $\gamma 16$ ble valgt som signaturpeptider for γ -enolase. $\gamma 4$ har aminosyresekvensen "GNPTVEVDLYTAK", $m/z =$

704,00, $t_R = 19,73$ og peptidet er to ganger ladet. $\gamma 16$ har aminosyresekvensen "ELPLYR", $m/z = 395,70$, $t_R = 18,77$ og peptidet er to ganger ladet. $\gamma 16$ skiller seg ut ved å ha signalintensitet mange ganger høyere enn $\gamma 4$, og er derfor mest aktuell å bruke til kvantifisering av γ -enolase da dette mest sannsynlig vil gi lavest LLOQ.



Figur 6-6 Signalintensiteten til seks utvalgte α -peptider analysert med full scan med seks ulike kollisjonsenergier. Se tabell 6-2 på side 53 for utfyllende informasjon av peptidene.

Tabell 6-3 viser resultatene fra undersøkelsen av peptidenes spesifisitet.

Tabell 6-3 Resultatet fra BLAST-søk for signaturpeptidene. De statistiske parameterne Bit score, E-verdi og aminosyredekning er forklart i avsnitt 5.4.3, side 46.

Aminosyresekvens	Protein	Bit score	E-verdi	Aminosyredekning
TIAPALVSK	α -enolase	29,5	$5,0 \cdot 10^{-4}$	9/9
	γ -enolase	24,4	$2,1 \cdot 10^{-2}$	7/8
ELPLYR	γ -enolase	23,5	$1,6 \cdot 10^{-2}$	6/6
	Probable tRNA(His) guanylyltransferase	21,0	$1,0 \cdot 10^{-1}$	5/6
GNPTVEVDLYTAK	γ -enolase	43,9	$2,0 \cdot 10^{-8}$	13/13
	β -enolase	38,4	$1,0 \cdot 10^{-6}$	12/13
	α -enolase	38,0	$2,0 \cdot 10^{-6}$	11/13
GNPTVEVDLFTSK	α -enolase	43,5	$2,0 \cdot 10^{-8}$	13/13
	γ -enolase	38,0	$2,0 \cdot 10^{-6}$	11/13
	β -enolase	34,6	$2,0 \cdot 10^{-5}$	11/13

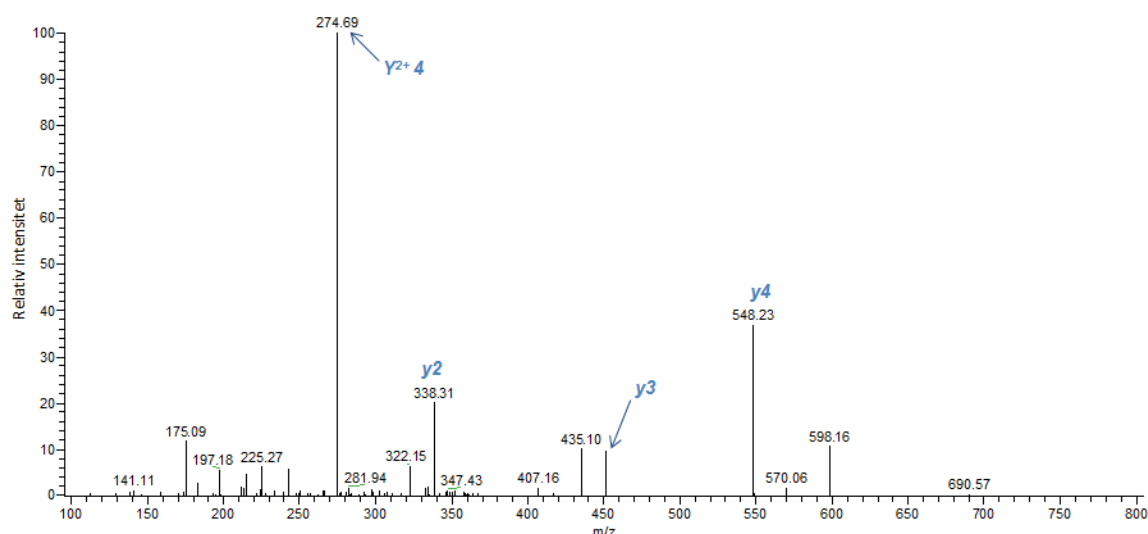
6.2 Optimalisering av MS-metoden

6.2.1 SRM

Selektivitet og sensitivitet er to viktige parametere for kvantitativ analyse av proteiner i biologiske prøver. SRM er den mest selektive og sensitive metoden man kan bruke ved analyse på trippelkvadrupol. Derfor ble det utviklet og optimalisert en SRM-metode for analyse av signaturpeptidene TIAPALVSK, GNPTVEVDLFTSK, GNPTVEVDLYTAK og ELPLYR.

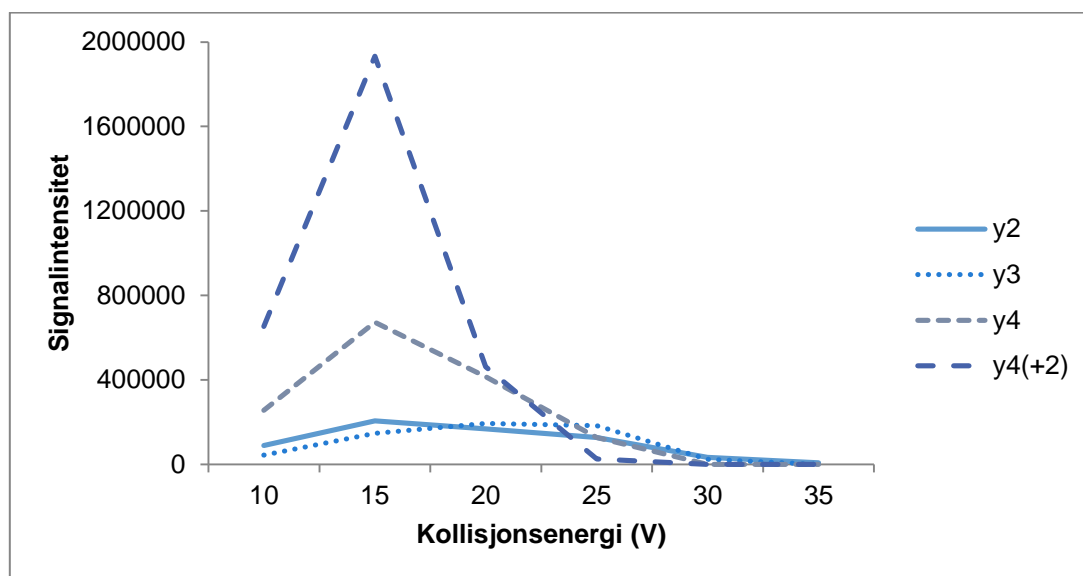
Ved utvikling av en SRM-metode må man først velge hvilke av peptidets fragmenter som skal analyseres i Q3. For best selektivitet monitoreres gjerne to eller flere fragmenter [6]. Man vil ofte bruke det fragmentet med høyest intensitet for kvantifisering, for størst S/N-forhold, men det er også viktig at fragmentet gir reproducerbare resultater.

Peptider fragmenteres i ulik grad, som nevnt tidligere. Det er derfor viktig å optimalisere kollisjonsenergien til hvert enkelt peptid. Med utgangspunkt i resultatene fra valg av signaturpeptider (6.1.3), hvor det ble testet seks ulike kollisjonsenergier, ble to til fem av de høyeste fragmentene for hvert peptid valgt ut for videre optimalisering. I nye forsøk ble kollisjonsenergien individuelt optimalisert for hvert signaturpeptid, og de to fragmentene som hadde høyest intensitet og ga mest stabile resultater ble valgt ut til den endelige SRM-metoden.

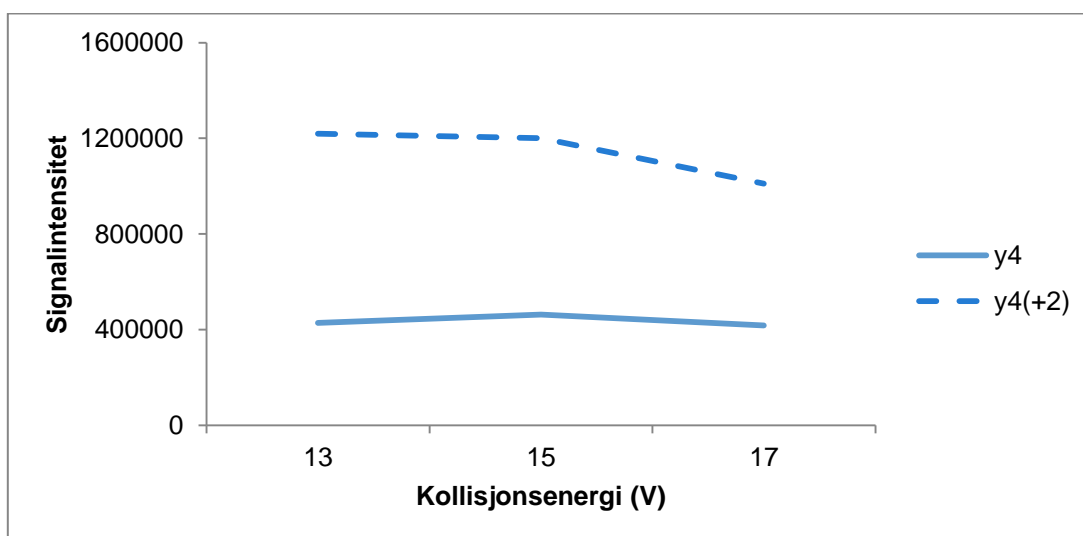


Figur 6-7 De fire markerte m/z-verdiene ble identifisert som fragmenter fra ELPLYR og ble valgt ut for videre monitorering og optimalisering, vist i figur 6-8 og 6-9.

Fremgangsmåten for valg av fragmenter og optimalisering av kollisjonsenergi presenteres med $\gamma 16$ (ELPLYR) som eksempel. Figur 6-7 viser hvilke fragmenter (y_2 , y_3 , y_4 og y_4^{+2}) som ble valgt for videre optimalisering av $\gamma 16$. Figur 6-8 viser signalintensiteten til disse fire fragmentene ved ulike kollisjonsenergi, hentet fra forsøket hvor signaturpeptidene ble valgt. På bakgrunn av dette forsøket, ble de to fragmentene med høyest intensitet (y_4 og y_4^{+2}) valgt for videre optimalisering. $\gamma 16$ ble i neste omgang analysert med kollisjonsenergi 13, 15 og 17 V (figur 6-9). Signalintensiteten til begge fragmentene er omtrent lik ved 13 og 15 V. Endelig kollisjonsenergi for $\gamma 16$ ble satt til 14 V.



Figur 6-8 Signalintensiteten til de fire markerte fragmentene i figur 6-7, analysert på trippelkvadrupol med kollisjonsenergi 10-35 V.



Figur 6-9 Signalintensiteten til de to fragmentene med høyest intensitet fra figur 6-8, analysert på trippelkvadrupol med kollisjonsenergi 13, 15 og 17 V.

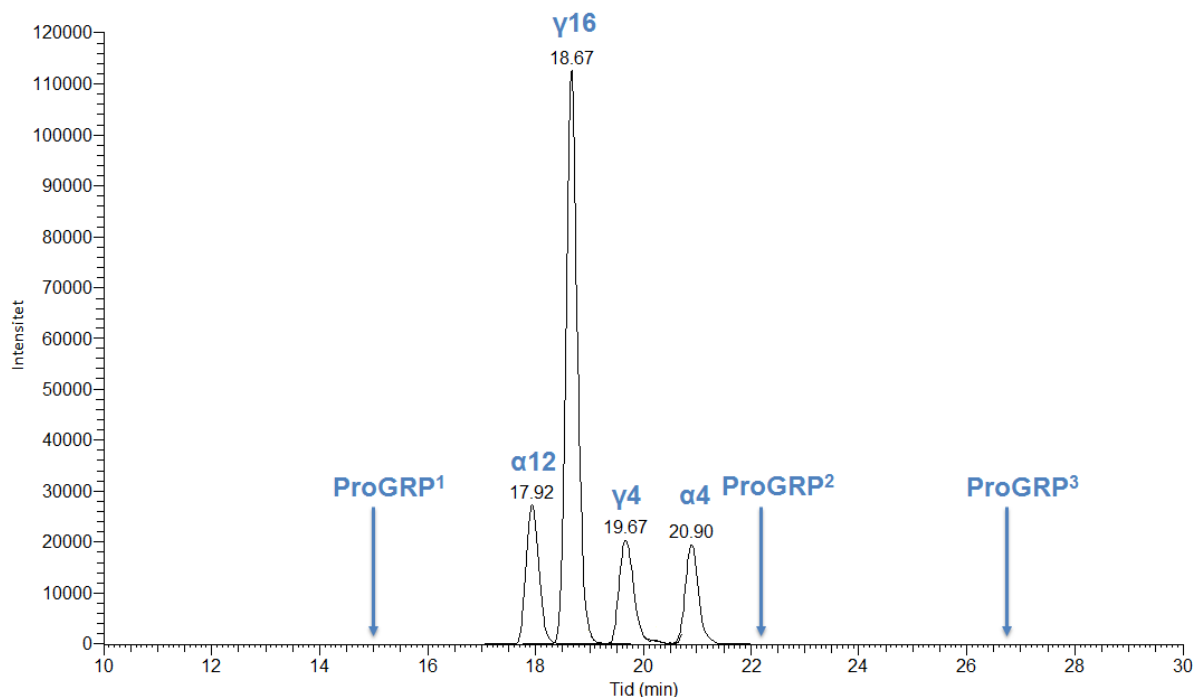
Tabell 6-4 SRM-metoden for kvantifisering av α - og γ -enolase. "m/z (Q1)" angir m/z-verdien til peptidet, mens "m/z (Q3)" angir m/z-verdien til fragmentionene som analyseres. I parenteser står det hvilken fragmentioner dette er. Start- og stopptid ble satt til $t_R \pm 1$ minutt.

Tryptisk peptid nummer	Aminosyresekvens	m/z (Q1)	m/z (Q3)	Kollisjonsenergi (V)	Starttid (min)	Stopptid (min)
α 12	TIAPALVSK	450,56	614,387 (y_6) 685,424 (y_7)	16	17,06	19,06
γ 16	ELPLYR	395,70	274,660 (y_4^{+2}) 548,320 (y_4)	14	17,77	19,77
γ 4	GNPTVEVDLYTAK	704,00	618,330 (y_{11}^{+2}) 938,480 (y_8)	20	18,73	20,73
α 4	GNPTVEVDLFTSK	704,29	618,330 (y_{11}^{+2}) 710,372 (y_6)	21	20,02	22,02

Peptidfragmentene og kollisjonsenergiene som brukes i den endelige SRM-metoden er presentert i tabell 6-4. I tabellen oppgis signaturpeptidenes opprinnelige retensjonstider. Etter bytte av kolonne i forkant av valideringen endret retensjonstidene seg noe mellom dagene. En endring i retensjonstid kan ha mange årsaker. De mest åpenlyse er endret sammensetning av mobilfase og endret temperatur, og dette ble derfor undersøkt. Etter flere forsøk med nylagde mobilfaser ble det fastslått at dette ikke var årsaken. HPLC-metoden bruker kolonneovn og vi kunne ikke finne noe galt med den. Det er derfor mye som tyder på at endringen i retensjonstidene skyldes at kolonnen ikke ble kjørt inn godt nok før bruk. Retensjonstidene ble i denne perioden kontrollert hver dag.

6.3 LC-metode

LC-metoden er utviklet av Silje Bøen Torsetnes, stipendiat ved Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo, for kvantifisering av ProGRP i serum [37]. Da den opprinnelige metoden viste seg å være godt egnet for NSE, ble det ikke sett noen grunn til å endre denne (figur 6-10). Signaturpeptidene til verken NSE eller ProGRP eluerer på samme tidspunkt. Når LC-metodene er like gjør det arbeidet med å slå sammen metodene for NSE og ProGRP lettere.



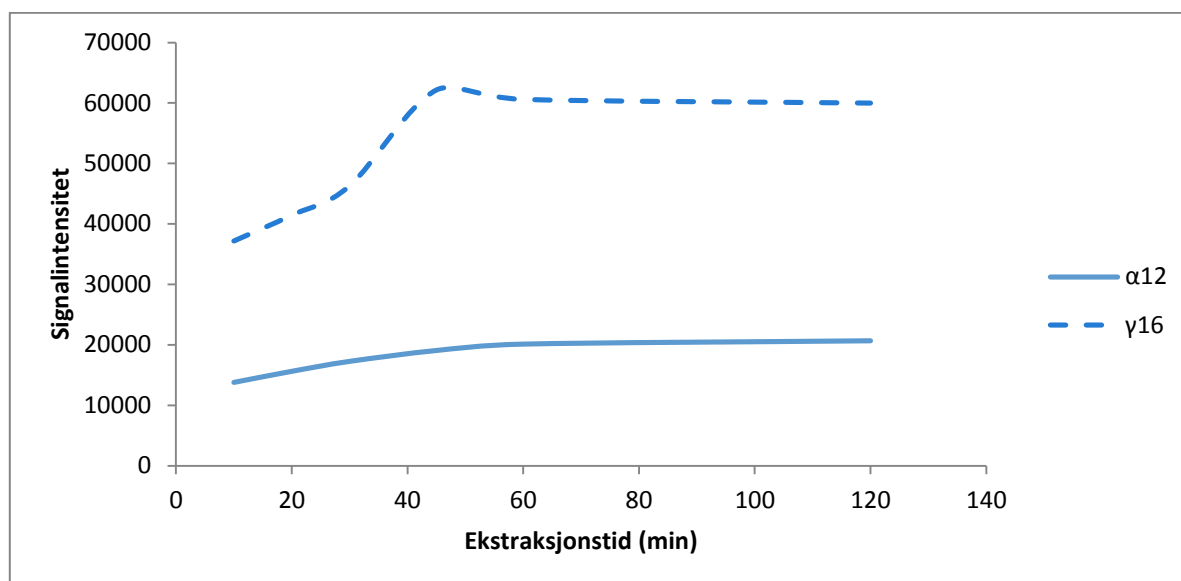
Figur 6-10 Kromatogram av signaturpeptidene for α - og γ -enolase. Retensjonstiden til de tre signaturpeptidene til ProGRP er markert.

6.4 Prøveopparbeidelse

Også prøveopparbeidelsen tar utgangspunkt i metoden utviklet av Silje Bøen Torsetnes, for kvantifisering av ProGRP i serum [37]. Det ble imidlertid gjort et forsøk på å optimalisere ekstraksjonstiden.

6.4.1 Ekstraksjonstid

Innledende forsøk med immunoekstraksjon av serum fra frisk donor viste, som forventet, tilstedeværelse av NSE, i form av α - og γ -enolase. Da antistoffene kun har affinitet for γ -enolase, og α -enolase derfor kun ekstraheres ut i komplekset $\alpha\gamma$, kan man med sikkerhet si at α -enolase stammer fra NSE. For å optimalisere ekstraksjonstiden ble serum fra frisk donor forsøkt ekstrahert i 10, 20, 30, 45, 60 og 120 minutter. Figur 6-11 viser signalintensiteten til $\alpha 12$ og $\gamma 16$ ved de ulike ekstraksjonstidene. Ekstraksjonstiden skal være et kompromiss mellom å få mest mulig analytt ekstrahert ut av prøveløsningen på kortest mulig tid. Av figuren kan man se at signalintensiteten til begge peptidene når et platå ved 60 minutter. Selv ved dobbelt så lang ekstraksjonstid øker ikke ekstraksjonsutbyttet bemerkelsesverdig. Ekstraksjonstiden ble satt til 60 minutter.



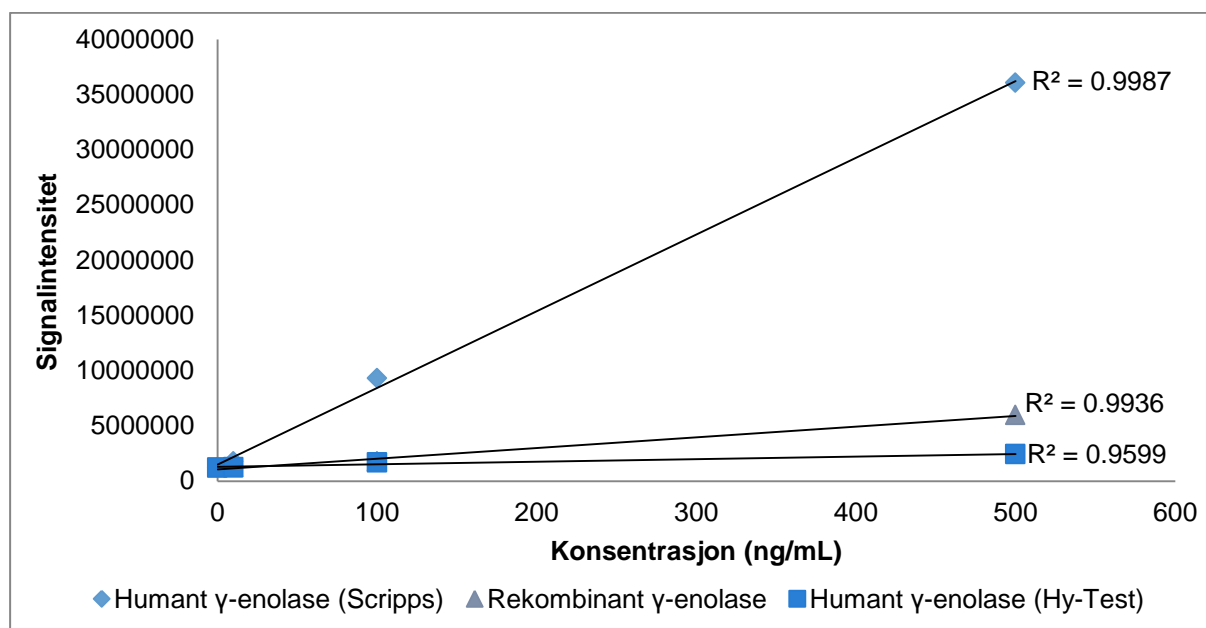
Figur 6-11 Signalintensiteten til $\alpha 12$ og $\gamma 16$ etter ekstraksjon i 10-120 minutter.

6.5 Pre-validering

6.5.1 Valg av valideringsstandard

Tre standarder for γ -enolase var tilgjengelige. Rekombinant γ -enolase produsert ved Radiumhospitalet [45] og humant γ -enolase rensset fra hjerne fra to ulike produsenter, Scripps Laboratories (Scripps) og Hy-Test Ltd (Hy-Test). Det ble bekreftet at standardene var rene løsninger av γ -enolase og ikke inneholdt α -enolase. Deretter ble signalintensitet og linearitet ved bruk av immunoekstraksjon testet. Det ble laget en fortynningsrekke hvor inntil 500 ng/mL ble tilsatt serum fra frisk donor. Det ble analysert to paralleller av hver prøve og resultatene er basert på gjennomsnittet av disse to parallellene. I figur 6-12 kan man se at γ -enolase fra produsenten Scripps Laboratories gir mye høyere signal enn de to andre standardene. Regresjonslinjen for γ -enolase (Scripps) viser også god linearitet ($r^2 = 0,9987$).

Konsentrasjonen til standardene er basert på konsentrasjonene oppgitt av leverandørene. Det er ikke gitt informasjon om hvilken form eller hvilke former av γ -enolase som er i løsningen. Den tydelige forskjellen i signalintensitet mellom γ -enolase (Scripps) og de to andre standardene tyder på at løsningen ikke inneholder like mengder dimere og monomere proteiner. Uavhengig av dette ble γ -enolase (Scripps) valgt som standard i valideringen.



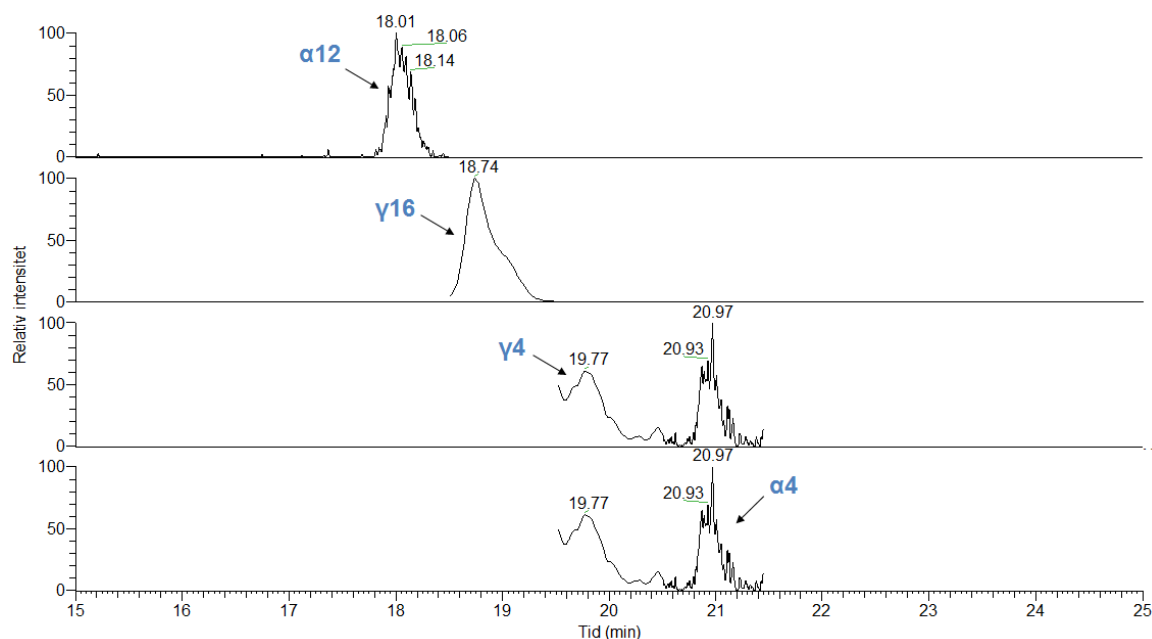
Figur 6-12 Regresjonslinjer med tilhørende r^2 -verdi for immunoekstrahert humant γ -enolase fra produsentene Scripps Laboratories og Hy-Test Ltd. og rekombinant γ -enolase tilsatt serum fra frisk donor i konsentrasjonsområdet 0 til 500 ng/mL.

6.5.2 Matriks fri for analytt

For å lage en standardkurve til bruk i kvantifisering, er man avhengig av å ha en matriks fri for analytt eller med en kjent mengde analytt. NSE forekommer naturlig i serum og det var derfor nødvendig å fjerne NSE fra matriksen. Siden antistoffbelagte magnetiske kuler var tilgjengelig var det naturlig å forsøke immunoekstraksjon for å fjerne NSE fra serum. Dette er en veldig selektiv metode som i prinsippet kun skal fjerne analytten og etterlate matriksen lik på alle andre måter [34].

En ekstraksjon

Det ble først undersøkt om NSE kunne fjernes fra serum med én enkelt ekstraksjon. 1 mL serum ble ekstrahert som beskrevet i avsnitt 5.2, i to omganger. Analyse av kulene fra den andre ekstraksjonen viser at det fortsatt er NSE til stede i serum etter én ekstraksjon (figur 6-13).

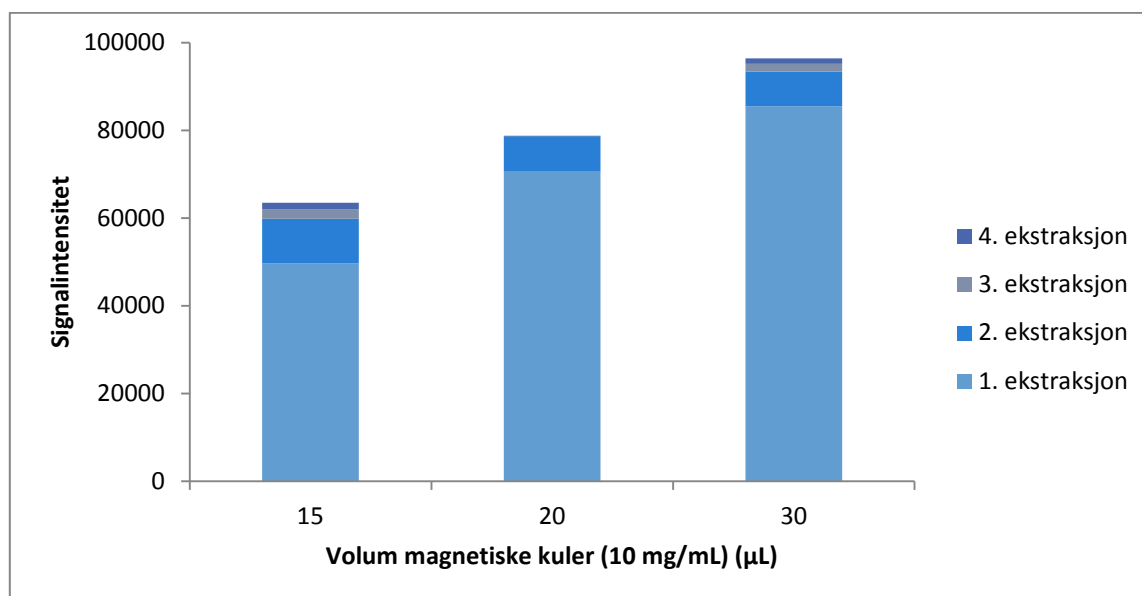


Figur 6-13 Kromatogram som viser de fire signaturpeptidene etter forsøk på å fjerne NSE i serum fra frisk donor med én ekstraksjon.

En enkelt ekstraksjon med 20 μ L antistoffbelagte magnetiske kuler viste å ikke fjerne all NSE fra serum og det måtte derfor forsøkes andre metoder. Under den enkle ekstraksjonen ble serum ekstrahert i 60 minutter, noe som allerede var vist å være ideell ekstraksjonstid. Økt ekstraksjonstid ville med andre ord ikke være et alternativ for å få mer NSE ekstrahert ut. Videre ble det undersøkt om flere antistoffbelagte magnetiske kuler eller flere ekstraksjoner kunne fjerne NSE fullstendig fra serum.

Flere antistoffbelagte magnetiske kuler og flere ekstraksjoner

To ulike volum kuler (15 og 30 μ L) ble testet og det ble gjort fire ekstraksjoner av 1 mL serum fra frisk donor. Ekstraksjonstiden var 60 minutter og forsøket ble gjort med to paralleller av hver prøve. Kulene fra hver ekstraksjon ble analysert for å undersøke hvor mye NSE som ble fjernet i hver ekstraksjon. Resultatet er presentert i figur 6-14.



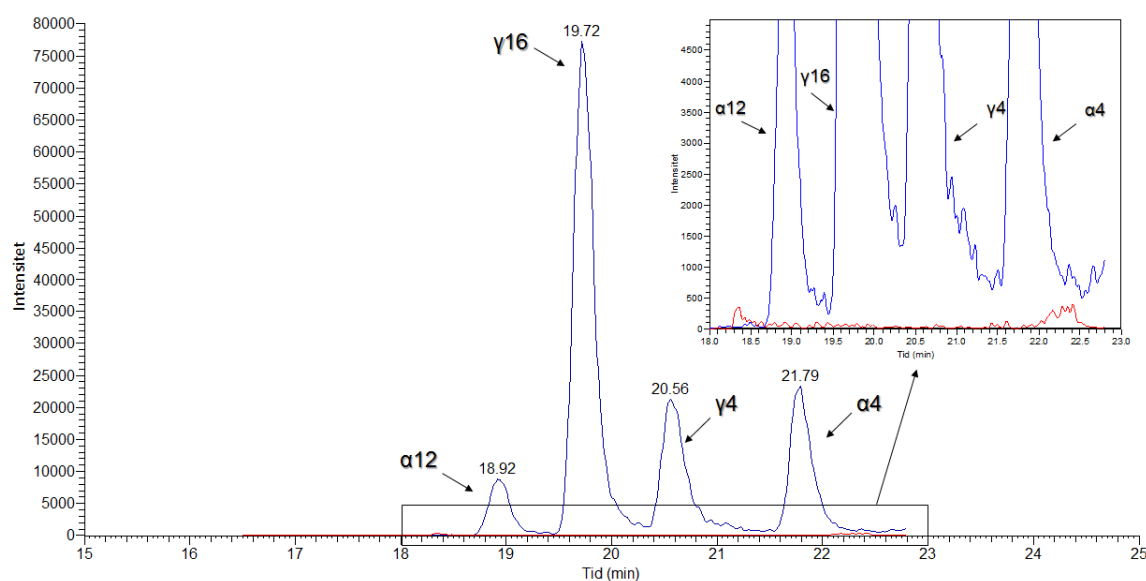
Figur 6-14 Signalintensiteten til $\gamma 16$ ved ekstraksjon av serum fra frisk donor, 1-4 ganger, med 15 og 30 μL , og 1 og 2 ganger med 20 μL antistoffbelagte magnetiske kuler.

Forsøket viste at kun en del av NSE fjernes ved hver ekstraksjon. Antatt at all NSE fjernes fra serum med fire ekstraksjoner, noe vi vet ikke er tilfelle, ser man en trend til at 80-90 % ekstraheres ut i den første ekstraksjonen. Deretter synker ekstraksjonsutbyttet til 60 % i andre ekstraksjon og 50 % i tredje ekstraksjon. Ved analyse av kulene fra fjerde ekstraksjon kan man fortsatt detektere NSE i serum. Det må antas at det på et tidspunkt opprettes en likevekt mellom antigen-antistoff og fritt antigen og at det alltid vil være en viss andel av NSE som ikke er bundet til antistoffer og at vi derfor ikke for fjernet all NSE. Man kan gjøre denne prosessen mange nok ganger til det praktisk talt ikke er noe NSE igjen, men da kreves det store mengder kuler, noe som ville blitt veldig kostbart. Det ble derfor besluttet å bruke en annen tilnærming i valideringen.

I figur 6-14 er det også tatt med resultater fra et forsøk hvor serum ble ekstrahert med 20 μL kuler i to omganger. Ved sammenlikning av resultatene fra disse to forsøkene kan man tydelig se at 30 μL gir et bedre utbytte enn 20 μL . LOD og LLOQ var tidligere vist å ikke være et problem da NSE ble detektert i serum fra frisk donor og det forventes høyere konsentrasjon i serum fra SCLC-pasient. Det ble derfor besluttet å fortsette å benytte 20 μL magnetiske kuler som et kompromiss mellom signalintensitet og økonomi.

6.5.3 Surrogatmatriks

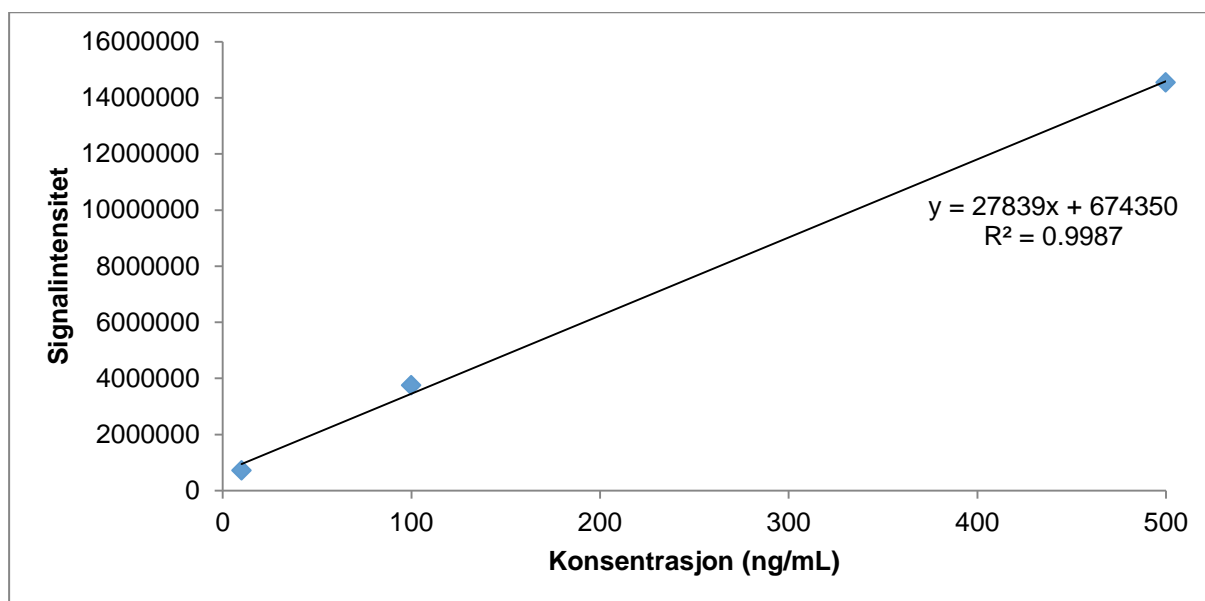
Da NSE ikke kunne fullstendig fjernes fra serum måtte andre metoder vurderes. Alternativene som ble vurdert var standard tilsetning og surrogatmatriks. Standard tilsetning har vært mye brukt i mange år og har den fordelen at den utelukker matriksforskjeller. Ulempen er at det generelt er et behov for større prøvevolum og lenger analysetid [34]. Det er kostbart med så store mengde serum som en validering krever, og i tillegg er det vist varierende signalintensitet for NSE fra donor til donor, noe som kan by på ytterligere utfordringer. Derfor ble det av praktiske og økonomiske grunner besluttet å undersøke om 5 % BSA i 1*PBS-løsning var egnet som surrogatmatriks. Først ble BSA testet for interfererende toppler. 5 % BSA ble analysert etter prøveopparbeidelse med immunoekstraksjon og proteolyse. Kromatogrammet i figur 6-15 viser ingen interfererende toppler og man kan dra slutningen om at verken 5 % BSA eller kulene interferer med signalene fra NSE.



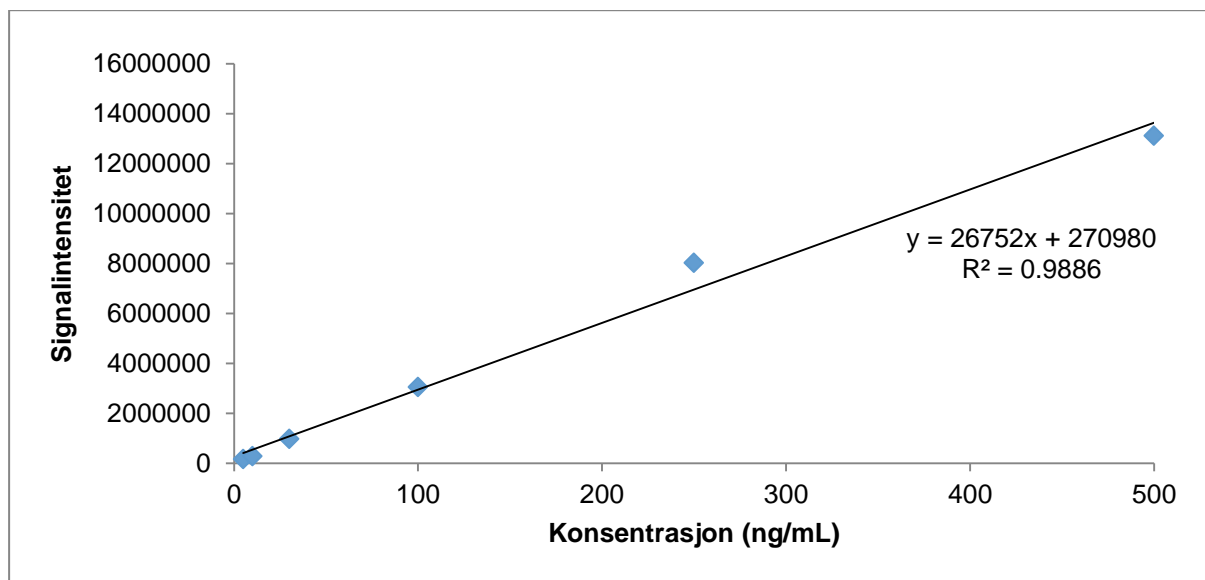
Figur 6-15 A: TIC av serum fra frisk donor og av uspiket 5 % BSA ved tiden 15 til 25 minutter. B: Samme kromatogram som i A zoomet inn til 16 ganger større, ved tiden 18 til 23 minutter.

Som beskrevet i avsnitt 3.5.1 er det viktig at analytten ekstraheres fra autentisk matriks og surrogatmatriks i tilsvarende grad. Dette ble undersøkt ved å analysere fortynningsrekker av γ -enolase (Scripps) i serum og i 5 % BSA, og deretter sammenlikne stigningstallene til kalibreringskurven. γ -enolase (Scripps) ble tilsatt i konsentrasjonsområdet 10 til 500 ng/mL i begge matriksene. Kalibreringskurvene (figur 6-16 og 6-17) har stigningstallene 27839 og 26752, for henholdsvis autentisk matriks og surrogatmatriks. Tilsvarende store stigningstall

indikerer at γ -enolase (Scripps) ekstraheres ut av autentisk matriks og surrogatmatriks i tilsvarende grad.



Figur 6-16 Kalibreringskurve for γ -enolase (Scripps) ekstrahert fra serum. Formelen og regresjonskoeffisienten (r^2) for linjen er beskrevet.



Figur 6-17 Kalibreringskurve for γ -enolase (Scripps) ekstrahert fra 5 % BSA. Formelen og regresjonskoeffisienten (r^2) for linjen er beskrevet.

Basert på disse to forsøkene som viser at 5 % BSA ikke gir interfererende topper og at γ -enolase (Scripps) ekstraheres ut av 5 % BSA i tilsvarende grad som i serum, ble 5 % BSA valgt som surrogatmatriks i valideringen av metoden.

6.6 Validering

Metoden ble validert for γ -enolase i 5 % BSA, ved bruk av immunoekstraksjon og tryptisk proteolyse som prøveopparbeidelse, og med analyse på trippelkvadrupol. Alle data i valideringen er basert på signaturpeptidet γ 16 (ELPLYR). Nøyaktighet, presisjon, linearitet, utbytte og stabilitet ble bestemt, mens LOD og LLOQ for metoden ble estimert. Metoden ble ikke validert for α -enolase da de antistoffbelagte magnetiske kulene kun har affinitet for γ -enolase, og α -enolase dermed bare ekstraheres når den er i kompleks med γ -enolase.

6.6.1 Nøyaktighet

Nøyaktigheten forteller hvor nær den observerte verdien er sann verdi. Tabell 6-5 viser målt gjennomsnittskonsentrasjon og prosentvis nøyaktighet, for tre konsentrasjoner av γ -enolase (Scripps). Metoden har en nøyaktighet på 91,5-100,9 %. Dette er innenfor retningslinjenes anbefalinger, som sier at gjennomsnittet av de beregnede konsentrasjonene bør være innenfor 20 % av den sanne konsentrasjonen ved den laveste konsentrasjonen og innenfor 15 % for de resterende konsentrasjonene.

Tabell 6-5 Metodens nøyaktighet ved konsentrasjonene 10, 100 og 500 ng/mL.

Tilsatt konsentrasjon av γ -enolase (ng/mL)	Gjennomsnittlig målt konsentrasjon (ng/mL) (n=5)	Intradag nøyaktighet (%) (n=5)
10	9,6	95,9
100	91,5	91,5
500	504,7	100,9

6.6.2 Presisjon

Presisjonen er et mål på spredning og viser hvor reproducerbare resultatene er innad i og mellom serier av målinger på tilsvarende prøver. Intradag presisjon (tabell 6-6) er $\leq 12,9$ % relativt standardavvik (RSD) for alle tre konsentrasjonene. Dette er bra med tanke på metodens kompleksitet. Interdag presisjon (tabell 6-6) er noe høyere, $\leq 20,2$ % RSD, men også dette er akseptabelt selv om det er noe høyere enn hva som er anbefalt for tradisjonelle

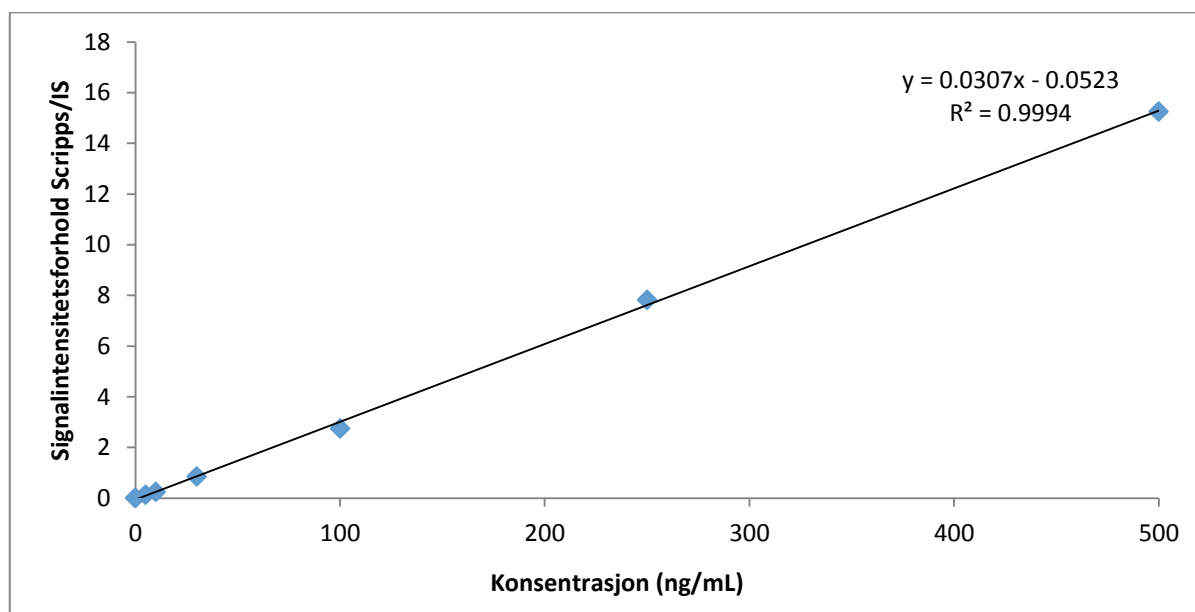
bioanalytiske metoder. Retningslinjene anbefaler at RSD skal være $\leq 20\%$ for den laveste konsentrasjonen og $\leq 15\%$ for de resterende konsentrasjonene.

Tabell 6-6 Intra- og interdagpresisjon ved tre konsentrasjoner.

Tilsatt konsentrasjon av γ -enolase (ng/mL)	Intradagpresisjon (RSD %) (n=5)	Interdagpresisjon (RSD %) (n=3)
10	9,8	20,1
100	3,1	20,2
500	12,9	4,2

6.6.3 Kalibreringskurve og linearitet

Lineariteten til en metode referer til en metodes evne til å danne signaler som enten direkte eller ved matematisk beregning er proporsjonal med konsentrasjonen av analytten i prøven. Koeffisienten for regresjonslinjen, r^2 , viser hvor godt regresjonslinjen representerer dataene. Metoden viser god linearitet i konsentrasjonsområdet 10-500 ng/mL, med $r^2 > 0,999$ (figur 6-18), noe som er bra med tanke på retningslinjenes anbefalinger på $r^2 > 0,99$ [46].



Figur 6-18 Kalibreringskurven for γ -enolase (Scripps) tilsatt 5 % BSA i konsentrasjonsområdet 10-500 ng/mL.

6.6.4 Deteksjonsgrense og nedre kvantifiseringsgrense

Metodens deteksjonsgrense (LOD) og nedre kvantifiseringsgrense (LLOQ) ble estimert ut ifra målinger gjort på 5 ng/mL γ -enolase (Scripps) i 5 % BSA i linearitetsforsøket (6.6.3). Grensene ble beregnet ved hjelp av likning 1 og 2 (side 47 og 48) og er et gjennomsnitt av to paralleller. Grensene på 11,0 og 38,0 pg/mL for henholdsvis LOD og LLOQ, er godt under de konsentrasjonene som er forventet å se i serum, enten det er i serum fra frisk eller fra syk donor.

Tabell 6-7 Estimert LOD og LLOQ for γ -enolase (Scripps) i 5 % BSA

LOD (pg/mL)	LLOQ (pg/mL)
11,0	38,0

6.6.5 Utbytte

Metodens utbytte er den evnen metoden har til å ekstrahere analytten fra matriksen. Utbyttet ble beregnet som beskrevet i avsnitt 5.5.7. Det er ikke et krav om at utbyttet skal være av en viss størrelse, men det må være reproduserbart og gi metoden god nok sensitivitet. Utbyttet varierer fra 62-82 % (tabell 6-8). 500 ng/mL skiller seg spesielt ut sammenliknet med 10 og 100 ng/mL. En årsak til at ekstraksjonsutbyttet er lavere for høye verdier kan være metning av antistoffene, men ut fra kalibreringskurven og regresjonskoeffisienten ser ikke dette ut til å være tilfellet. Metodens gode nøyaktighet både ved lave og høye konsentrasjoner tyder også på at variasjonen i utbyttet skyldes tilfeldigheter og ikke metning av antistoffene.

Tabell 6-8 Ekstraksjonsutbytte for γ -enolase (Scripps) tilsatt 5 % BSA i konsentrasjonene 10, 100 og 500 ng/mL.

Konsentrasjon (ng/mL)	Utbytte (%)
10	82
100	77
500	62

6.6.6 Stabilitet

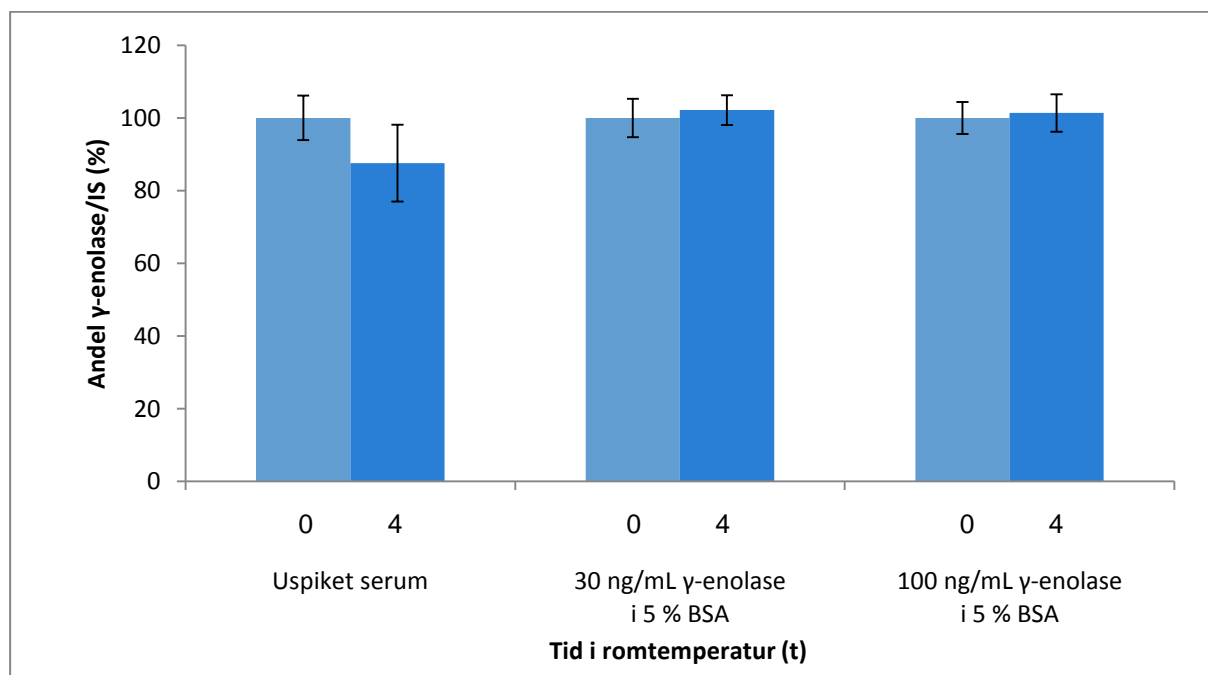
Serum inneholder proteaser og andre enzymer som kan modifisere strukturen til proteiner og peptider eller degradere dem på andre måter [5, 7]. Selv etter ekstraksjon fra biologisk matriks kan proteiner og peptider gjennomgå ulike degraderingsprosesser [7]. Det er derfor viktig å undersøke om analytten er stabil i den biologiske matriksen og ekstraktet, slik at de rette oppbevaringsbetingelsene kan settes.

Valideringen gjøres som kjent i en surrogatmatriks, men for at resultatene fra stabilitetsforsøkene skal kunne direkte overføres til den reelle situasjonen ble stabiliteten av analytt i matriks også undersøkt i serum.

Stabilitet av analytt i matriks

Stabilitet i romtemperatur

Da det kan forekomme at prøver under analysen blir oppbevart på benken ble det undersøkt hvor godt prøvene tålte å stå i romtemperatur i 4 timer. Dette ble undersøkt for både uspiket serum og γ -enolase (Scripps) i 5 % BSA ved to konsentrasjoner. Resultatene er presentert i figur 6-19.



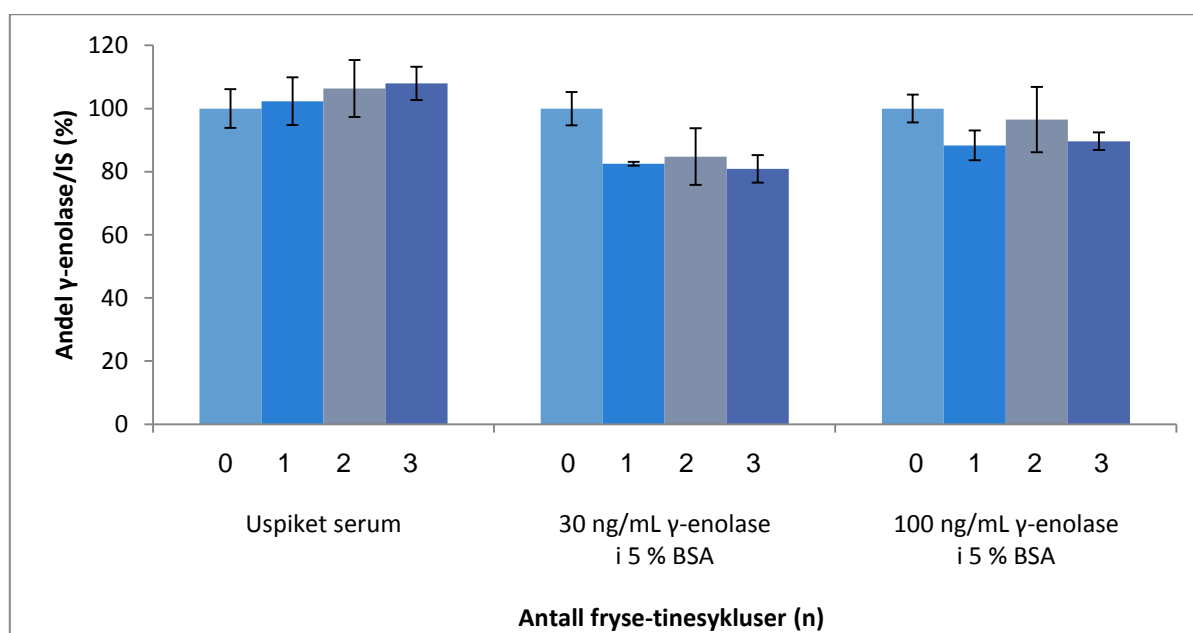
Figur 6-19 Andel NSE (\pm SD) i serum og γ -enolase (Scripps) (\pm SD) i 5 % BSA før og etter oppbevaring i romtemperatur i 4 timer. Prøvene som var nylig tillaget ved analyse er satt til 100 %.

Forsøkene med γ -enolase (Scripps) tilsatt 5 % BSA viser ingen markant endring i konsentrasjonen etter oppbevaring i romtemperatur i 4 timer. Disse prøvene kan derfor oppbevares på denne måten.

Man kan se en tendens til nedgang i konsentrasjonen av NSE for serumprøvene, men tar man metodens variasjon i betraktning er det vanskelig å si om dette er en reell nedgang. Tiden som prøvene oppbevares i romtemperatur bør allikevel begrenses til et minimum.

Fryse-tine stabilitet

Pasientprøver kan bli utsatt for gjentatt frysing og tining og det er derfor nødvendig å evaluere hvor stabil analytten er i den aktuelle matriksen ved slik behandling. Fryse-tinestabiliteten ble testet for uspiket serum og for γ -enolase (Scripps) i 5 % BSA ved to konsentrasjoner. Resultatene er presentert i figur 6-20.



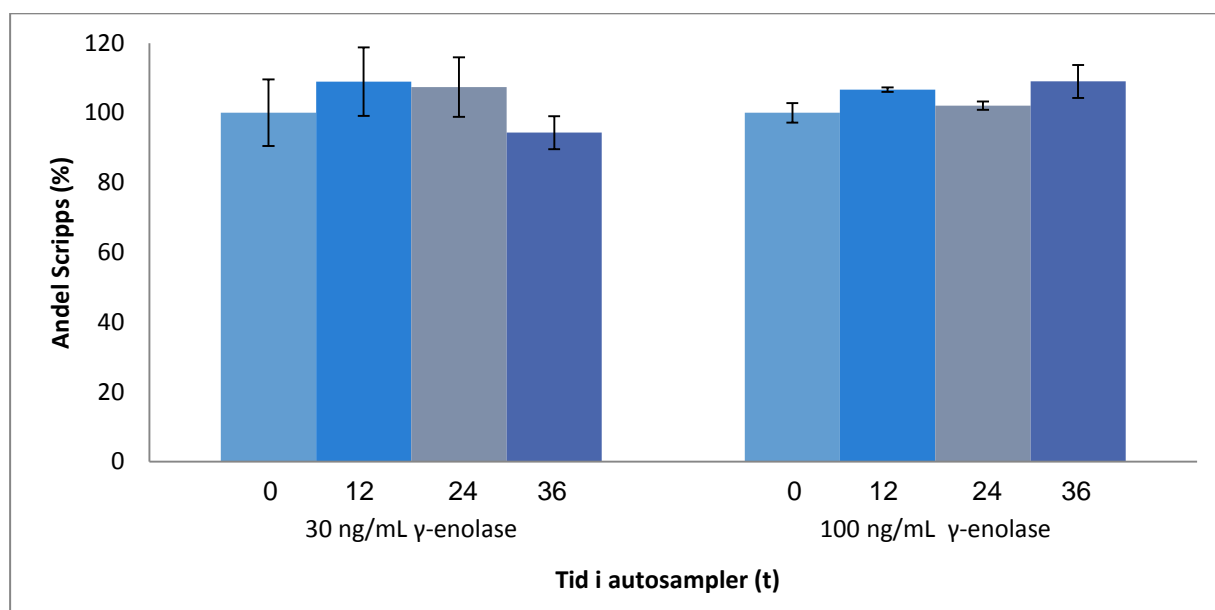
Figur 6-20 Andel NSE (\pm SD) i serum og γ -enolase (Scripps) (\pm SD) i 5 % BSA etter at prøvene hadde vært fryst og tint 0, 1, 2 og 3 ganger. Prøvene som var nylig tillaget (fryst og tint 0 ganger) er satt til 100 %.

De uspikete serumprøvene viser en gjennomsnittlig økning i konsentrasjon av NSE ved hver fryse-tinesyklus. Ved tredje fryse-tinesyklus har konsentrasjonen økt med 8 %. Det er ikke sannsynlig at NSE-konsentrasjonen øker ved hver fryse-tinesyklus, derfor må det antas at variasjonen skyldes metodens variasjon. Det kan konkluderes med at prøvene tåler denne behandlingen.

For 5 % BSA tilsatt γ -enolase (Scripps) var variasjonen større. Forsøket viser at hele 20 % γ -enolase (Scripps) brytes ned eller på en annen måte forsvinner ved gjentatte fryse-tinesyklus. 5 % BSA tilsatt Scripps bør derfor ikke fryses.

Stabilitet av analytt i ekstrakt

Det er ikke uvanlig at prøver blir stående i autosamplere i en lengre periode når mange prøver skal analyseres samtidig. Derfor er det viktig å teste om ekstraktene tåler dette. Resultatet fra forsøket, presentert i figur 6-21, viser liten variasjon ved injeksjon etter 0, 12, 24 og 36 timer. Da kjølingen til autosampleren var ute av drift, sto prøvene i romtemperatur under forsøket. Normalt ville temperaturen vært 4 °C. Det er naturlig å anta at resultatene ikke ville blitt dårligere dersom kjølingen i autosampleren hadde fungert. Det er heller sannsynlig at resultatene hadde blitt bedre, og det kan derfor konkluderes med at prøvene kan stå i autosampleren i opptil 36 timer.



Figur 6-21 Andel γ -enolase (Scripps) (\pm SD) etter at ekstraktet hadde stått i autosampler i 0, 12, 24 og 36 timer. Prøvene som ble analysert ved tiden 0 timer er satt til 100 %.

6.6.7 Selektivitet

Metodens selektivitet bestemmes ved analyse av blanke matriksprøver fra minimum seks individer, for å utelukke at matriks inneholder stoffer som interfererer med signalene til analytten. I dette tilfellet er det ikke mulig å bevise selektiviteten da NSE finnes naturlig i

serum. Selektiviteten til metoden er bygget inn prøveopparbeidelsen med selektiv immunoekstraksjon og i analysen med selektiv SRM-analyse.

For å undersøke selektivitet av valideringsprøvene ble det analysert fire blanke 5 % BSA-prøver. Analysene gav, som forventet, samme resultat som i pre-valideringen (6.5.3), ingen interfererende topper for verken γ -enolase eller IS.

7 Konklusjon og videre arbeid

I denne oppgaven har det blitt utviklet en metode for kvantifisering av NSE i serum. Metoden benytter immunoekstraksjon for selektiv opprensing av proteinet NSE, i form av isoformene $\alpha\gamma$, $\gamma\gamma$ og γ , fra serum. Deretter proteolyseres proteinene med trypsin før de analyseres på LC-MS/MS i SRM-modus. Signaturpeptider for proteinene ble identifisert for både α - og γ -enolase, men på grunn av antistoffets spesifisitet for γ -enolase og kun tilgang på NSE-standarder som var rene løsninger av γ -enolase, ble metoden kun validert for γ -enolase.

Valideringen viser at metoden kan kvantifisere NSE med akseptabel nøyaktighet og presisjon i konsentrasjonsområdet mellom 10 og 500 ng/mL. Responsen er lineær og kvantifiseringsgrensen er langt lavere enn referansekonsentrasjonsnivåene.

Metoden har vist å kunne detektere NSE i serum fra frisk donor (10 ng/mL). Ved ulike sykdomstilstander vil NSE-nivået i serum være økt (>100 ng/mL), og det er bevist at metoden er egnet for deteksjon av NSE i konsentrasjoner opptil 500 ng/mL.

Metoden gjør det også mulig å differensiere mellom α - og γ -enolase, noe som kan være av stor interesse for videre forskning på SCLC. Om metoden er et bedre alternativ enn dagens metoder for kvantifisering av NSE i serum ved diagnose og oppfølging av SCLC, må undersøkes. Første trinn i dette vil være en sammenligning av den nyutviklede LC-MS/MS-metoden og den immunometriske metoden for bestemmelse av NSE ved å analysere et større antall pasientprøver.

Bestemmelse av NSE ved hjelp av den validerte LC-MS/MS metoden er i utgangspunktet kompatibel med den validerte metoden for å bestemme ProGRP. Dette er et godt grunnlag for å kunne slå sammen begge metodene, slik at man i én enkel multipleks analyse kan bestemme begge markører og deres isoformer.

Kildeliste

1. Kreftforeningen. *Lungekreft/Cancer pulm.* 2011 [besøkt 18.04 2012]; Tilgjengelig fra: http://www.kreftforeningen.no/om_kreft/kreftformer/lungekreft.
2. Holdenrieder, S., et al., *Nucleosomes, ProGRP, NSE, CYFRA 21-1, and CEA in monitoring first-line chemotherapy of small cell lung cancer.* Clin Cancer Res, 2008. **14**(23): s. 7813-21.
3. Shibayama, T., et al., *Complementary roles of pro-gastrin-releasing peptide (ProGRP) and neuron specific enolase (NSE) in diagnosis and prognosis of small-cell lung cancer (SCLC).* Lung Cancer, 2001. **32**(1): s. 61-9.
4. Bjerner, J., et al., *Reference intervals for carcinoembryonic antigen (CEA), CA125, MUC1, Alfa-foeto-protein (AFP), neuron-specific enolase (NSE) and CA19.9 from the NORIP study.* Scand J Clin Lab Invest, 2008. **68**(8): s. 703-13.
5. Ewles, M. og L. Goodwin, *Bioanalytical approaches to analyzing peptides and proteins by LC--MS/MS.* Bioanalysis, 2011. **3**(12): s. 1379-97.
6. Halquist, M.S. og H. Thomas Karnes, *Quantitative liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of macromolecules using signature peptides in biological fluids.* Biomed Chromatogr, 2011. **25**(1-2): s. 47-58.
7. van den Broek, I., et al., *Quantitative bioanalysis of peptides by liquid chromatography coupled to (tandem) mass spectrometry.* Journal og Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2008. **872**(1-2): s. 1-22.
8. Hoofnagle, A.N. og M.H. Wener, *The fundamental flaws of immunoassays and potential solutions using tandem mass spectrometry.* J Immunol Methods, 2009. **347**(1-2): s. 3-11.
9. Alberts, B., et al., *Essential Cell Biology.* 2nd ed. 2004, New York og London: Garland Science.
10. Nelson, D.L. og M.M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry.* 2000, New York: Worth Publishers.
11. Carr, S.M. *Four levels of Protein Structure.* 2012 [besøkt 17.04 2012]; Tilgjengelig fra: http://www.mun.ca/biology/scarr/iGen3_06-04.html.
12. Kristiansen, T. *Proteomikk - omfang og mål.* [besøkt 16.04 2012]; Tilgjengelig fra: http://snl.no/proteomikk/omfang_og_m%C3%A5l.
13. Liebler, D.C., *Introduction to Proteomics.* 2002, Totowa: Humana Press. 198.

14. Romijn, E.P., J. Krijgsveld, og A.J. Heck, *Recent liquid chromatographic-(tandem) mass spectrometric applications in proteomics*. J Chromatogr A, 2003. **1000**(1-2): s. 589-608.
15. Brewis, I.A. og P. Brennan, *Proteomics technologies for the global identification and quantification of proteins*. Adv Protein Chem Struct Biol, 2010. **80**: s. 1-44.
16. Chen, G. og B.N. Pramanik, *Application of LC/MS to proteomics studies: current status and future prospects*. Drug Discov Today, 2009. **14**(9-10): s. 465-71.
17. *Bottom-up proteomics*. 2011 [besøkt]; Tilgjengelig fra: http://en.wikipedia.org/wiki/Bottom-up_proteomics.
18. Meyerhof, O., *New investigations on enzymatic glycolysis and phosphorylation*. 1948. Experientia, 1994. **50**(4): s. 382-9.
19. Tracy, M.R. og S.B. Hedges, *Evolutionary history of the enolase gene family*. Gene, 2000. **259**(1-2): s. 129-38.
20. Qin, J., et al., *Structures of asymmetric complexes of human neuron specific enolase with resolved substrate and product and an analogous complex with two inhibitors indicate subunit interaction and inhibitor cooperativity*. J. Inorg. Biochem., 2012.
21. UniProt. *Alpha-enolase*. [besøkt 29.03 2012]; Tilgjengelig fra: <http://www.uniprot.org/uniprot/P06733>.
22. UniProt. *Beta-enolase*. [besøkt 29.03 2012]; Tilgjengelig fra: <http://www.uniprot.org/uniprot/P13929>.
23. UniProt. *Gamma-enolase*. [besøkt 29.03 2012]; Tilgjengelig fra: <http://www.uniprot.org/uniprot/P09104>.
24. McAleese, S.M., et al., *Complete amino acid sequence of the neurone-specific gamma isozyme of enolase (NSE) from human brain and comparison with the non-neuronal alpha form (NNE)*. Eur J Biochem, 1988. **178**(2): s. 413-7.
25. Paus, E. og A.T. Myklebust, *Expression and interconversion of neuron-specific enolase in patient sera and extracts from small-cell lung cancer cells*. Tumour Biol, 1996. **17**(5): s. 271-80.
26. *Enolase 2*. 2011 [besøkt]; Tilgjengelig fra: http://en.wikipedia.org/wiki/Enolase_2.
27. Bischoff, N.G.a.R., *Sample Preparation of Body Fluids for Proteomics Analysis*, in *Proteomics og Human Body Fluids - Principles, Methods, and Applications*, V. Thongboonkerd, Editor. 2007, Humana Press Inc.: Bangkok.
28. Pedersen-Bjergaard, S. og R.K. E., *Legemiddelanalyse*. 2004.

29. Gilbert S. Omenn, R.M., Marcin Adamski, Thomas Blackwell, og W.G. Brian B. Haab, and David J. States, *The Human Plasma and Serum Proteome*, in *Proteomics of Human Body Fluids: Principles, Methods, and Applications*, V. Thongboonkerd, Editor. 2007, Humana Press Inc.: Bangkok.
30. Paus, E., et al., *TD-12 workshop report: characterization of monoclonal antibodies to neuron-specific enolase*. *Tumour Biol*, 2011. **32**(4): s. 819-29.
31. Paus, E. og K. Nustad, *Immunoradiometric assay for alpha gamma- and gamma gamma-enolase (neuron-specific enolase), with use of monoclonal antibodies and magnetizable polymer particles*. *Clin Chem*, 1989. **35**(10): s. 2034-8.
32. *Protein Reduction & Alkylation*. 2011 [besøkt 17.04 2012]; Tilgjengelig fra: <http://www.gbiosciences.com/ResearchProducts/Protein-Research/Protein-Electrophoresis/Sample-preparation/Protein-Reduction-and-Alkylation.aspx>.
33. Chen, G. og B.N. Pramanik, *LC-MS for protein characterization: current capabilities and future trends*. *Expert Rev Proteomics*, 2008. **5**(3): s. 435-44.
34. van de Merbel, N.C., *Quantitative determination of endogenous compounds in biological samples using chromatographic techniques*. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2008. **27**(10): s. 924-933.
35. Giorgianni, F., et al., *LC-MS/MS Analysis of Peptides with Methanol as Organic Modifier: Improved Limits of Detection*. *Analytical Chemistry*, 2004. **76**: s. 11.
36. Scientific, T., *Thermo Scientific AQUASIL C18 HPLC Columns*, in *Technical Guide*. 2009.
37. Torsetnes, S.B., et al., *Digging deeper into Small Cell Lung Cancer. Can targeted LC-MS reveal tomorrow's diagnostic level?* Manuskript under utarbeidelse.
38. Kicman, A.T., M.C. Parkin, og R.K. Iles, *An introduction to mass spectrometry based proteomics-detection and characterization of gonadotropins and related molecules*. *Mol Cell Endocrinol*, 2007. **260-262**: s. 212-27.
39. Wysocki, V.H., et al., *Mass spectrometry of peptides and proteins*. *Methods*, 2005. **35**(3): s. 211-22.
40. Niessen, W.M., *Progress in liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation and its impact on high-throughput screening*. *J Chromatogr A*, 2003. **1000**(1-2): s. 413-36.
41. *Electrospray Ionization*. [besøkt 06.05 2012]; Tilgjengelig fra: http://www.magnet.fsu.edu/education/tutorials/tools/ionization_esi.html.

42. *Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation*, U.S.D.o.H.a.H. Services, Editor. 2001.
43. *Guideline on bioanalytical method validation*, E.m. agency, Editor. 2011.
44. Gingras, A.C., R. Aebersold, og B. Raught, *Advances in protein complex analysis using mass spectrometry*. J Physiol, 2005. **563**(Pt 1): s. 11-21.
45. Aoki, T., et al., *Characterization of recombinant human neuron-specific enolase and its application to enzyme immunoassay*. Tumour Biol, 1993. **14**(5): s. 261-70.
46. Kollipara, S., et al., *International Guidelines for Bioanalytical Method Validation: A Comparison and Discussion on Current Scenario*. 2011(3): s. 201-217.

Appendiks 1

Oversikt over tryptiske peptider som genereres ved proteolyse av α -enolase. m/z -verdiene er basert på søk i ProteinProspector. Spesifikke peptider, merket i grått, er funnet ved BLAST-søk.

	Sekvens	m	[m+H] ⁺¹	[m+2H] ⁺²	[m+3H] ⁺³	[m+4H] ⁺⁴
1-5	MSILK	590.7954	591.7954	296.8977	198.2651	
6-9	IHAR	468.5932	469.5932	235.7966	157.5311	
10-15	EIFDSR	765.8337	766.8337	384.4169	256.6112	
16-28	GNPTVEVDLFTSK	1406.5727	1407.5727	704.7864	470.1909	
29-32	GLFR	428.6019	429.6019	215.8010	144.2006	
33-50	AAVPSGASTGIYEALRL	1805.0381	1806.0381	904.0191	603.0127	
51-54	DNNDK	490.4807	491.4807	246.7404	164.8269	
55-56	TR	275.3171	276.3171	139.1586	93.1057	
57-60	YMGK	497.6252	498.6252	250.3126	167.2084	
61-64	GVSK	389.4623	390.4623	196.2312	131.1541	
65-71	AVEHINK	809.9338	810.9338	406.4669	271.3113	
72-80	TIAPALVSK	899.1128	900.1128	451.0564	301.0376	
81	K					
82-89	LVNTEQEK	960.0660	961.0660	481.5330	321.3553	
90-92	IDK	374.4476	375.4476	188.7238	126.1492	
93-103	LMIEDMGTENK	1280.4985	1281.4985	641.7493	428.1662	
104-105	SK	233.2766	234.2766	118.1383	79.0922	
106-120	FGANAILGVSLAVCK	1518.8530	1519.8530	760.9265	507.6177	
121-126	AGAVEK	573.6584	574.6584	288.3292	192.5528	
127-132	GVPLYR	703.8522	704.8522	353.4261	235.9507	
133-162	HIADLAGNSEVILPVPAFNVINGGSHAGNK	3010.5697	3011.5697	1506.7849	1004.8566	753.8924
163-179	LAMQEFMILPVGAANFR	1906.9870	1907.9870	954.9935	636.9957	
180-183	EAMR	505.6047	506.6047	254.3024	169.8682	
184-193	IGAENVYHNLK	1143.3238	1144.3238	573.1619	382.4413	
194-197	NVIK	472.5963	473.5963	237.7982	158.8654	
198-199	EK	275.3141	276.3141	139.1571	93.1047	
200-202	YGK	366.4274	367.4274	184.7137	123.4758	
203-221	DATNVGDEGGFAPNILENK	1961.0928	1962.0928	982.0464	655.0309	
222-228	EGLELLK	800.9640	801.9640	401.9820	268.3213	
229-233	TAIGK	488.5957	489.5957	245.7979	164.1986	
234-239	AGYTDK	653.7016	654.7016	328.3508	219.2339	
240-253	VVIGMDVAASEFFR	1540.8205	1541.8205	771.9103	514.9402	
254-256	SGK	290.3288	291.3288	146.6644	98.1096	
257-262	YDLDFK	799.8918	800.8918	401.4459	267.9639	
263-269	SPDDPSR	772.7819	773.7819	387.8910	258.9273	
270-281	YISPDQLADLYK	1425.6290	1426.6290	714.3145	476.5430	
282-285	SFIK	493.6149	494.6149	248.3075	165.8716	
286-306	DYPVVSIEDPFDQDDWGAWQK	2510.6800	2511.6800	1256.8400	838.2267	
307-326	FTASAGIQVVGDDLTVTNPK	2030.2877	2031.2877	1016.6439	678.0959	
327	R					
328-330	IAK	330.4377	331.4377	166.7189	111.4792	
331-335	AVNEK	559.6313	560.6313	281.3157	187.8771	
336-343	SCNCLLLK	893.1499	894.1499	448.0750	299.0500	
344-358	VNQIGSVTESLQACK	1576.8078	1577.8078	789.9039	526.9359	
359-372	LAQANGWGVMSVSHR	1525.7710	1526.7710	764.3855	509.9237	
373-394	SGETEDTFIADLVVGLCTGQIK	2296.6023	2297.6023	1149.8012	766.8674	
395-400	TGAPC	603.7098	604.7098	303.3549	202.5699	

401-403	SER	390.4063	391.4063	196.7032	131.4688	
404-406	LAK	330.4377	331.4377	166.7189	111.4792	
407-412	YNQLLR	805.9456	806.9456	404.4728	269.9819	
413-420	IEEELGSK	903.9984	904.9984	453.4992	302.6661	
421-422	AK	217.2772	218.2772	110.1386	73.7591	
423-426	FAGR	449.5208	450.5208	226.2604	151.1736	
427-429	NFR	435.4937	436.4937	219.2469	146.4979	
430-434	NPLAK	541.6596	542.6596	272.3298	181.8865	

Appendiks 2

Oversikt over tryptiske peptider som genereres ved proteolyse av γ -enolase. m/z-verdiene er basert på søk i ProteinProspector. Spesifikke peptider, merket i grått, er funnet ved BLAST-søk.

	Sekvens	m	[m+H] ⁺¹	[m+2H] ⁺²	[m+3H] ⁺³
1-5	MSEIK	606.3120	607.3120	304.1560	203.1040
6-9	IWAR	544.3194	545.3194	273.1597	182.4398
10-15	EILDSR	731.3886	732.3886	366.6943	244.7962
16-28	GNPTVEVDLYTAK	1405.7162	1406.7162	703.8581	469.5721
29-32	GLFR	491.2929	492.2929	246.6465	164.7643
33-50	AAVPSGASTGIYEALRL	1803.9440	1804.9440	902.9720	602.3147
51-54	DGDK	433.1882	434.1882	217.5941	145.3961
55-56	QR	302.1775	303.1775	152.0888	101.7258
57-60	YLGK	479.2817	480.2817	240.6409	160.7606
61-64	GVLK	415.2867	416.2867	208.6434	139.4289
65-89	AVDHINSTIAPALISSGLSVVEQEK	2577.3723	2578.3723	1289.6862	860.1241
90-103	LDNLMLELDGTENK	1603.7836	1604.7836	802.8918	535.5945
104-105	SK	233.1448	234.1448	117.5724	78.7149
106-120	FGANAILGVSLAVCK	1519.8141	1520.8141	760.9071	507.6047
121-126	AGAAER	573.2944	574.2944	287.6472	192.0981
127-132	ELPLYR	789.4458	790.4458	395.7229	264.1486
133-162	HIAQLAGNSDLILPVPFNVINGGSHAGNK	3023.6014	3024.6014	1512.8007	1008.8671
163-179	LAMQEFMILPVGAESFR	1937.9816	1938.9816	969.9908	646.9939
180-183	DAMR	491.2235	492.2235	246.6118	164.7412
184-193	LGAEVYHTLK	1129.6204	1130.6204	565.8102	377.5401
194-197	GVIK	415.2867	416.2867	208.6434	139.4289
198-199	DK	261.1397	262.1397	131.5699	88.0466
200-202	YGK	366.1976	367.1976	184.0988	123.0659
203-228	DATNVGDEGGFAPNILENSEALELVK	2701.3155	2702.3155	1351.6578	901.4385
229-233	EAIDK	574.3035	575.3035	288.1518	192.4345
234-239	AGYTEK	667.3250	668.3250	334.6625	223.4417
240-253	IVIGMDVAASEFYR	1569.7934	1570.7934	785.8967	524.2645
254-256	DGK	318.1612	319.1612	160.0806	107.0537
257-262	YDLDFK	799.3825	800.3825	400.6913	267.4608
263-269	SPTDPSR	758.3632	759.3632	380.1816	253.7877
270-285	YITGDLGALYQDFVR	1857.9334	1858.9334	929.9667	620.3111
286-306	DYPVVSIEDPFDQDDWAWSK	2482.1038	2483.1038	1242.0519	828.3679
307-326	FTANVGIIQIVGDDLTVTNPK	2101.1128	2102.1128	1051.5564	701.3709
327	R				
328-330	IER	416.2456	417.2456	209.1228	139.7485
331-335	AVEEK	574.3035	575.3035	288.1518	192.4345
336-343	ACNCLLLK	992.4744	993.4744	497.2372	331.8248
344-358	VNQIGSVTEAIQACK	1617.8105	1618.8105	809.9053	540.2702
359-372	LAQENGWGVMSHR	1582.7747	1583.7747	792.3874	528.5916
373-394	SGETEDTFIADLVVGLCTGQIK	2353.1432	2354.1432	1177.5716	785.3811
395-400	TGAPCR	661.2926	662.2926	331.6463	221.4309
401-403	SER	390.1936	391.1936	196.0968	131.0645
404-406	LAK	330.2340	331.2340	166.1170	111.0780
407-412	YNQLMR	823.4083	824.4083	412.7042	275.4694
413-422	IEEELGDEAR	1159.5430	1160.5430	580.7715	387.5143
423-429	FAGHNFR	847.4162	848.4162	424.7081	283.4721
430-434	NPSVL	528.2980	529.2980	265.1490	177.0993